

2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆宇

概要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、不活化ポリオワクチン、弱毒生ロタワクチンを検定、検査対象としている。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、ポリオワクチン、ロタワクチンの検定、検査を担当する。本年度はポリオ単独不活化ワクチン（サノフィ：イモバックスポリオ）の出検は無く、全て沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチンDPT-sIPV, 2種類（一般財団法人阪大微生物病研究会：テトラビック皮下注シリンジ、一般財団法人化学及血清療法研究所：クワトロバック皮下注シリンジ）のみが出検された。中間段階5件、小分け製品14件の検定を行った。ロタウイルスワクチンについてはGSK：ロタリックスが3件、MSD：ロタテックが11件出検され、検定を行った。サノフィ社のポリオ単独ワクチンを第一三共社のDPTと混合した沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチンDPT-cIPV、サノフィ第一三共：スクエアキッズ皮下注シリンジの承認前検査が終了した。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究が進行し、新規リアソータントが国内で主要流行株となっていることを見いだした。

ノロウイルスに関しては、感染研はレファランスセンターとしての機能を良く果たしている。カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。X線解析、クライオ電顕による構造解析に関する研究に加え、ノロウイルスのリバースジェネティクスに関する研究進展があった。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地

域では2000年以来ポリオフリーを維持してきたが、2011年には中国の新疆ウイグル自治区で野生型ポリオの流行が確認された。流行は終息したが今後も注視していく必要がある。JICAとの共催により実施した第23回ポリオ実験室診断技術研修会（ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第4回目）ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。また、国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、行政検査をおこなった。

エンテロウイルス71は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を併発することがある。エンテロウイルス71の感染受容体、ヒトPSGL-1に関する解析を進めている。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。さらに、これまで研究班として行ってきた「肝炎ウイルス検査陽性者追跡システムの構築」は厚労省の「ウイルス性肝炎患者等の重症化予防事業」の中で新たに事業化され、全国レベルでの展開を目指している。最近、HIV陽性同性愛者間で急性C型肝炎が急増していることを見出し、自治体に対策を促し、沈静化しつつある。基礎研究促進を目的に、肝炎研究基盤整備事業で肝炎セミナーを4回開催した。さらに、12月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。基礎研究としては、B型肝炎ウイルス研究も進んでいる、ウイルス感染や複製増殖に関わる宿主因子などの同定が進んだ。C型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開

されている。

第5室の最重要課題はA型及びB型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年度はA型肝炎ワクチン3件、B型肝炎ワクチン14件の検定をおこなった。B型肝炎ワクチンの定期接種化も見据えて検定数のさらなる増加に備える必要がある。このために動物を用いた力価試験から試験管内力価試験への切り替えが望まれる。E型肝炎ウイルスの研究では感染性 cDNA クローンを樹立し報告した。また、ラットやフェレットのE型肝炎ウイルスの解析が進んだ。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

第4室

Lingbao Kong (中国、江西省、江西農業大学) <China Scholarship Council>平成25年8月24日～平成26年8月24日、C型肝炎分子生物学に関する研究。

第5室

楊 婷婷 (中国、山東省青島市疾病予防控センター) <日中笹川奨学金制度研究者>平成24年9月6日～平成25年8月26日、E型肝炎分子生物学に関する研究。

人事面では、平成25年4月に第2室に中村朋史任期付研究員が、第3室に杉山隆一任期付研究員が、第4室に藤本陽任期付研究員がそれぞれ採用された。また、平成25年10月に第一室に芳賀慧任期付研究員が採用された。新職員の皆さんの活躍に大いに期待する。

<別> 検査業務

第1室：

検定業務

- ・ 4種混合ワクチンの力価試験（ラット免疫原性試験）14ロット
- ・ 3価混合不活化ポリオワクチン原液の不活化試験 5ロット
- ・ イモバックスポリオの力価試験（D抗原量試験） 0ロット
- ・ ロタリックス検定 3件
- ・ ロタリックス検定 11件

承認前検査

スクエアキッズ皮下注シリンジ（終了）

行政検査

第1室

ノロウイルス・サポウイルス・ロタウイルス

合計7件

第2室：

平成25年度は1件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスはワクチン株と同定された。

第5室：

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン	3件
組換え沈降B型肝炎ワクチン（酵母由来）	14件

行政検査

A型肝炎 2件

E型肝炎 2件

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ヒトノロウイルスリバーシジェネティクスシステム構築に関する研究

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバーシジェネティクスシステムは、ノロウイルスのゲノム RNA の 5' 末端に 107 塩基の付加配列が結合した capped RNA を合成する。この RNA から ORF1 タンパク質が非常に効率よく転写され、その後、RNA の複製行程が稼働する。107 塩基の付加配列を切り離し、ノロウイルスゲノム RNA が付加配列無く転写されるように調製した pKS-U201-53R では、ORF1 の転写が正常に起きるが、感染性粒子を放出しないことが明らかになった。現在、107 塩基の付加配列がどのような機能を有するのかを調べている。

[戸高玲子, 村上耕介, 朴英斌, 中西章(国立長寿医療研究センター)片山和彦]

(2) リバーシジェネティクスシステムを用いたヒトノロウイルスの複製機構の解析

ヒトノロウイルスの複製機構を明らかにするため、U201 株 HuNoV 発現プラスミドを導入した HEK293FT 細胞を透過型電子顕微鏡により解析した。その結果、直径 150~500 nm の小胞が細胞内に観察され、それらの小胞の周囲には約 20 nm の粒子が存在することを明らかにした。また小胞を形成している最中と考えられる膜構造物も観察された。現在は、これらの膜構造物の詳細を明らかにするため、免疫電子顕微鏡による解析を進めている。

[村上耕介, James Broughman, Mary Estes (米国ペイラー医科大学), 片山和彦]

(3) ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスに加え、マウスノロウ

イルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を試みた。ヒトノロウイルスのリバーシジェネティクスシステムをベースに構築した pKS-MNV-S7 プラスミドは、HEK293T 細胞にトランフェクションすると感染性新生 MNV-S7 ウイルスを産生する。このプラスミドクローンの MNV-ORF1 にコードされる N-terminal protein と NTPase の間に GFP を挿入したコンストラクトは、GFP 遺伝子が挿入されたゲノムを持つ感染性粒子を産生することが明らかになった。また、テトラシステインタグを VP2 に挿入したコンストラクトも感染性粒子を産生した。産生した新生ウイルス粒子は、RAW 細胞に感染し自己増殖する事に加え、増殖中の細胞を蛍光ラベルできることが明らかになった。[中西章(国立長寿医療研究センター)、戸高玲子、村上耕介、三木元博(デンカ生研)、脇田隆宇、片山和彦]

(4) ヒトノロウイルスのゲノム解析

2011 年 4 月~2012 年 3 月の間に全国 20 カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い、NoV 遺伝子型 GII/4GII/3, GII/2 のゲノム全長の塩基配列の解析を試みた。少なくとも 9 種の GII/4 の単系統亜株が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。ゲノム解析に次世代シーケンスシステム (NGS; イルミナ社 MiSeq) を導入することに成功した。便中のノロウイルスゲノム RNA 量が 10^6 コピー以上存在する場合、PCR エンリッチメントを行うことなく全ゲノム塩基配列を解析可能であった。今後の網羅的ヒトノロウイルスゲノム解析において有用な解析手法となることが期待される。

[芳賀慧、片山和彦、戸高玲子、横山 勝、佐藤裕徳(病原体ゲノム解析研究センター)、黒田誠]

(5) ノロウイルス網羅的全ゲノム塩基配列解析と GatVirusWeb の構築

ノロウイルス (NoV) は、構造タンパク質領域のゲノム塩基配列を用いて、GI から GV の 5 つのグループに分類できる。このうち、人に感染するのは GI, II, IV である。GI, GII にはそれぞれ遺伝的に異なる 14-17 種類以上の genotype の存在が示唆されている。これら全ての genotype の全長塩基配列解析を目的とし、新規に 2 種類

の genotype の全塩基配列を決定した。さらに、CaliciWeb をアップグレードした下痢症ウイルス全般を含むウイルスデータベース、情報共有サイトの GatVirusWeb を立ち上げ、国内外への塩基配列データ共有化を進めた。

[三瀬敬治 (札幌医大) , 三木元博 (デンカ生研) , 戸高玲子, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(6) ヒトノロウイルスの遺伝子型分別方法の国際統一にかかる研究

ヒトノロウイルスの遺伝子型分類は、従来より構造タンパク質領域の配列に基づいて行われてきた。本方法は、2004 年に、我々によって定義された方法である。近年、ノロウイルスは ORF1 と ORF2 のジャンクション領域に存在するホットスポットでの遺伝子組換え頻度が当初の予測に比し非常に高頻度である事が明らかにされ、遺伝子組換えを考慮に入れた新規遺伝子型分別法の確立が求められていた。本年度、我々は、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティー (国際的に合意の得られた遺伝子型別を決定する組織) の一員として、この要望に答える ORF1 の RdRp コード領域と ORF2 の capsid コード領域を用いた遺伝子型分類法を確立した。

[片山和彦, 戸高玲子, 村上耕介]

(7) ノロウイルス非構造タンパク質の機能解析

ヒトノロウイルス (NoV) の ORF1 にコードされる非構造タンパク質 3A-like protein (p22) に ER リテンションシグナル配列が存在することを明らかにした。p22 は、細胞内の小胞体からトランスゴルジ間のタンパク質の膜輸送システムに影響を与え、狭間に NoV の複製の場を形成する機能があることが示唆された。この現象はプラスミドベースのリバースジェネティクスシステムでも、同様に観察される普遍的な現象であることが明らかになった。

[Sue E. Crawford, Tyler M. Sharp, Susana Guix (BCM) , 片山和彦, Mary K. Estes (BCM)]

(8) ノロウイルスの網羅的 VLP および抗体の作製

ヒトノロウイルスは、感染モデル動物も存在せず、培養細胞で増殖させることもできず研究の進行が遅れている。

ノロウイルスの研究、抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と、それを用いて作製する抗血清は、研究用ツールとして極めて有用である。当部室では、VLP と抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は 6 種類の新たなヒトノロウイルス VLP、抗血清を作製した。

[三木元博 (デンカ生研) , 朴英斌, 戸高玲子, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(9) ノロウイルス食中毒事例調査のためのシーケンスデータ共有化

ノロウイルス (NoV) の広域食中毒事例の早期探知に有効と考えられるシーケンスデータの共有化を実施する中で見いだされた GII.4 は、オーストラリアのシドニーで検出された株と同一クラスターを形成し世界的大流行を起こした株である事が明らかになった。GII.4 2012 変異株と呼称されることとなったこれらの株に関する時系列塩基配列データを集積し、ゲノム上に生じた配列変異に関する研究を進める予定である。

[片山和彦, 村上耕介, 朴英斌, 山下和予 (感染症情報センター) , 横山 勝, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析研究センター) 、ノロウイルスリサーチグループジャパン (地方衛生研究所有志)]

(10) マウスノロウイルス (MuNoV) のウイルス蛋白質間とそのゲノム RNA との相互作用

ノロウイルスの複製機構解明のため Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV 蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖 RNA), nsRNA (新規合成された RNA) 間の細胞内相互作用を、免疫沈降法を用いて調べた。複製に必須のポリメラーゼは、N-terminal protein, NTPase, VPg, dsRNA と、ウイルス粒子主構成成分 VP1 は VP2, VPg, nsRNA と相互作用することを示唆する結果を得た。

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセイフティー) , 朴英斌, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(11) ヒトノロウイルスの感染に関与する真のレセプターの探索法の検討

我々は、組織血液型抗原 (HBGA) はヒトノロウイルス (HUNoV) の腸管粘膜層への接着には関与するが、細胞への結合には別の分子が関与していることを明らかにした。本年度は、候補分子を腸管上皮細胞のプロテオミクス解析により取得した。この候補分子の HuNoV の細胞感染への関与を解析するため、リバーシジェネティクスシステムにより作出された、遺伝子改変ヒトノロウイルス U201 株 HuNoV を用いることとした。しかし、遺伝子改変 HuNoV を HEK293T の上清より回収する際、上清中に残存するトランスフェクション-プラスミド DNA 複合体の混入が問題となったことから、その除去法の検討を行った。その結果、DNAase 処理だけでなく遠心分離法も効果的であることを明らかにした。

[村上耕介, Mary Estes (米国ベイラー医科大学), 片山和彦]

(12) ノロウイルス中和抗体認識部位の同定

ヒトノロウイルスは、株化された感受性細胞が無いため、試験管内で増殖させることができない、そのため抗体の中和効果を検出することができず、VLP で誘導した抗体を用いた研究成果により、感染防御に関わる抗体を予測している。一方、マウスノロウイルスは、感受性細胞 RAW での試験管内増殖は可能だが、VLP を安定して作成することができない。我々は、マウスノロウイルス VLP の安定した作成に成功した。この MNV-VLP をマウス、ウサギ、モルモットに免役し、中和活性のある抗血清を誘導することに成功した。今後、MNV-VLP 免疫マウスからモノクローナル抗体を作製を予定している。中和活性のあるモノクローナル抗体の作出に成功すれば、その抗体と VLP の結合様式を結晶構造解析で調べることにより、ノロウイルスの中和機構を明らかにできる可能性がある。[戸高玲子, 三木元博 (デンカ生研)、村上耕介, 朴英斌, 片山和彦]

(13) ヒトノロウイルス感受性細胞樹立の試み

ヒトノロウイルス感受性細胞をスクリーニングするため、リバーシジェネティクスシステムにより、GFP 遺

伝子を内包した感染性ヒトノロウイルス粒子を作製した。この感染性ウイルスは、ウイルスプロテアーゼの活性をノックアウトしてあるため、感染細胞はウイルス感染後もダメージを受けず、生存を続けることができる。さらに、本ウイルスの感染により、細胞内に GFP が発現するため、感受性細胞を GFP の傾向の有無により分別可能である。現在、細胞にダメージをほとんど与えず、密閉されたカセットないでのセルソーティングが可能な On Chip Bio 社のセルソーターを用いて、感受性細胞のスクリーニングを行っている。[戸高玲子, 三木元博 (デンカ生研)、村上耕介, 朴英斌, 片山和彦]

(14) ノロウイルスキャプシドタンパク質サブドメインの大腸菌での発現

ノロウイルス Chiba407 株 (GI. 4) および Narita104 株 (GII. 4) の VLP に対するヒト型モノクローナル抗体のエピトープを特定するための材料として、それぞれのキャプシドタンパク質 (VP1 タンパク質) を 5 つのサブドメイン (N 末領域, S ドメイン, P1N ドメイン, P2 ドメイン, P1C ドメイン) に分け、SUMO プロテアーゼとの融合タンパク質遺伝子を作成し、大腸菌で発現させる系を構築した。SUMO 融合タンパク質を生成し、SUMO プロテアーゼ領域を除去した後、それぞれのサブドメインを用いて、ヒト型抗体の反応性を今後調べる。

[染谷雄一, 守口匡子 (藤田保健衛生大学医学部)]

(15) NoV と血液型抗原との結合: 結晶構造を基にしたキャプシドタンパク質とルイス抗原との結合エネルギー解析

NoV の糖鎖認識の多様性を理解するため、ルイス抗原に対して親和性を示す GI/2 遺伝子型株 (Funabashi 258 株) を用い、結晶学的な解析を進めている。これまでに、キャプシドタンパク質上によく保存された 1 つの Gal (NAc) 結合部位と、3 つの Fuc 結合部位が存在し、各糖鎖とキャプシドタンパク質との相互作用の強弱は、水素結合による相互作用の数で大凡は説明出来ることを明らかにしてきた。今年度は、糖鎖認識特異性の素因を解

明するため、QM/MM 法および分子動力学計算による解析を試みた。1 アミノ酸変異を想定し、Funabashi 258 株の野生型 (Q389) と変異型 (Q389N) における Le^b 抗原への親和性の違いを解析の対象とした。野生型では Le^b 抗原への親和性が低く、変異型では親和性が高い。まずそれぞれの型の糖鎖複合体結晶構造から溶媒和の影響を考慮した水素原子を含む水和モデルを計算機上で構築し、続いて QM/MM 計算で最適化構造を得た。さらに糖鎖認識に關与する水素結合パラメーターを抽出し、相互作用エネルギーの見積もりを行った。また平行して、分子動力学的解析を実行し、糖鎖複合体中での糖鎖の構造分布を解析することで、柔軟多様な糖鎖を集団構造として比較した。解析の結果、糖鎖の構造や糖鎖とタンパク質との相互作用エネルギーには大きな差は見いだせず、Le^b 抗原に対する野生型と変異型の親和性の違いは、変異による糖鎖結合ポケットの構造変化に誘発された水和構造の変化に由来することが示唆された。

[白土東子, 石田豊和 (産総研), 熊谷安希子, 伊藤浩美 (産総研), 古川早苗 (産総研), 染谷雄一, 石井孝司, 脇田隆字, 成松 久 (産総研), 久保田智巳 (産総研)]

(16) ヒト型抗ノロウイルス抗体のウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討

本研究では、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数の抗 NoV 抗体を単離・解析し、交叉反応性抗 NoV 中和抗体の作製を試みる。昨年度までに、Narita 104 株 (GII.4) の VLP を抗原に用いて単離した 3 種のヒト型抗体 (12A2, 12A11, 12B10) と Chiba 株 (GI/4) の VLP を抗原に用いて単離した 3 種のヒト型抗体 (CV-1A1, CV-1A5, CV-2F5) による血液型抗原 (HBGA) への VLP 吸着に対する阻害活性を検討してきた。今年度は、別人 2 名の末梢血を用いて作製された抗体ライブラリーから Narita 104 株を抗原に用いてそれぞれ単離された 1A9 と 5A8 について、HBGA への VLP 吸着阻害活性を検討した。その結果、両者ともに、12A2, 12B10 同様、H, A, B, Le^b 抗原全てへの r104 の吸着を阻害した。これらの抗体は、中和抗体である可能性、ドミナントな中和エピトープをとらえてい

る可能性が示唆される。これら抗体が認識する、ウイルスタンパク質上の抗原エピトープを解析・同定することは、ワクチン開発という観点からも意義深いと思われる。

[白土東子, 守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学), 谷口孝喜 (藤田保健衛生大学)]

(17) マウスノロウイルス (MuNoV) 感染細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノム RNA との相互作用

ノロウイルスの複製機構解明のため Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV 蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖ウイルス RNA), nsRNA (新規合成されたウイルス RNA) 間の細胞内相互作用を免疫沈降法を用いて調べた。ウイルス粒子主構成成分 VP1 は VP2, VPg, nsRNA と、複製に必須のポリメラーゼは N-terminal protein, NTPase, VPg, dsRNA に加え、構造蛋白質 VP2 も相互作用することを示唆する結果を得た。

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセイフティ), 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(18) マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内局在

ノロウイルスの複製機構を明らかにするため、Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV の蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖 RNA), nsRNA (新たに合成された RNA) の細胞内局在を蛍光デコンボリューション顕微鏡によって調べた。複製に必須のポリメラーゼは核周辺部位に dsRNA と、ウイルス粒子主構成成分 VP1 蛋白質は細胞質全体に nsRNA と共局在した。MuNoV の複製は核周辺部位で、粒子形成は細胞質で起こり、それぞれに關与する RNA 種が示唆された。

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセイフティ), 村上耕介, 戸高玲子, 脇田隆字, 片山和彦]

(19) マウスノロウイルス (MNV) 感染性粒子の粒子構造の研究

ノロウイルスの感染性ウイルス粒子は、構造タンパク質 (VP1) 180 分子と、VP2, VPg, genome RNA で構成されて

いると考えられている。また、ウイルス粒子の外部構造は、ウイルス様中空粒子と同等であると考えられている。ヒトノロウイルス (HuNoV) では、VLP の構造は良く解析されているが、感染性粒子の外部並びに内部構造は明らかにされていない。また、MNV では、感染性粒子の外部構造が VLP とは若干異なる形状を示していることが報告されている。我々はノロウイルスの感染性粒子構造を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡観察、クライオ位相差トモグラフィを用いた、感染性ウイルス粒子の外部、内部構造を研究している。本年度は、MNV-VLP の安定産生と精製に成功し、感染性 MNV とともにクライオ電子顕微鏡鏡像の取得に成功した。ノロウイルスにおける初めての感染性粒子と VLP の比較検討が開始された。

[村上耕介, 戸高玲子, 朴 英斌, 高木弘隆 (バイオセーフティ), 村田和義 (岡崎生理研), 脇田隆字, 片山和彦]

(20) ヒトノロウイルス・マウスノロウイルスのウイルスタンパク質の結晶構造解析の試み

ノロウイルスで、タンパク質翻訳因子、ゲノム合成開始因子などの機能が予測されている VPg と構造タンパク質と非構造タンパク質としての機能を併せ持つと予測されている VP2 の二つの分子に加え、本年度は、これらの分子とコンプレックスを形成して活性を發揮することが予測されている RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の構造解析を開始した。HuNoV, MNV RdRp の結晶化に成功し、X 線によるリフレクションパターンの取得に成功した。現在、立体構造を構築し、解析を進めている。

[朴英斌, 朴三用 (横浜市立大学), 戸高玲子, 脇田隆字, 片山和彦]

2. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築

昨年度、我々は FCV ゲノム cDNA をコードする plasmid を培養細胞に transfection するだけで FCV 感染性粒子を回収できる single step リバーシジェネティクス系の構築に成功した。本年度は FCV のリバーシジェネティクス系をプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングに利用し、化

合物ライブラリーを用いたスクリーニングを開始した。

[岡智一郎, 横山勝 (病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医)]

3. ロタウイルスに関する研究

(1) 我が国におけるロタウイルスの VP7 遺伝子型分布

我が国におけるロタウイルスの網羅的分子疫学調査を実施するため、全国6病院から5歳未満の急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。2012年2月から2012年7月の間に合計165検体を収集し、ELISA法にてスクリーニングを行ったところ、121検体がロタウイルス陽性であった。その内訳は苫小牧市立病院 (北海道) 5検体, 由利組合総合病院 (秋田県) 42検体, 公立昭和病院 (東京都) 3検体, 江南厚生病院 (愛知県) 54検体, 公立南丹病院 (京都府) 14検体, 山口大学医学部附属病院 (山口県) 3検体であった。VP7 の遺伝子型は G1 が 75 検体 (62%), G3 が 9 検体 (7%), G9 が 37 検体 (31%) であった。[藤井克樹, 芳賀慧, 下池貴志, デニス・フランシス, 片山和彦]

(2) 全遺伝子型構成解析によるロタウイルス分子疫学研究

2012年に収集したロタウイルス陽性検体について、全11セグメントの塩基配列を解析し、全検体の遺伝子型構成を決定した。G1 (75検体) のうち、21検体 (28%) は典型的な Wa-like 遺伝子型構成 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) であったが、54検体 (72%) は外殻タンパク質以外が DS-1-like 遺伝子型構成 (G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) を示す遺伝子分節再集合体であった。また、G3とG9の検体は全て Wa-like 遺伝子型構成であった。DS-1-like G1 タイプが主流株となったのは世界的に見ても異例である。

[藤井克樹, 芳賀慧, 下池貴志, 片山和彦]

(3) ロタウイルス遺伝子型別の流行分布と重症度との関連性に関する研究

2012年に収集したロタウイルス陽性検体について、そのVP7遺伝子型と、発生時期や流行地域との間に偏りがあるか検討した結果、2012年シーズンの前半（2月から4月）はG9が多く、後半（5月から7月）はG1が多く検出される傾向があった。G9にはlineage3とlineage6の2種類が存在していたが、lineage6は京都と愛知からのみ検出され、秋田からは1株も検出されなかった。G1のWa-like株とDS-1-like株の分布については明確な地域差は認められなかった。また、遺伝子型と重症度（Vesicari scoreおよび中枢神経症状の有無）の間に明らかな偏りは認められなかった。

[藤井克樹、芳賀慧、下池貴志、片山和彦]

(4) ロタウイルスゲノムRNAの電気泳動によるパターン解析

ロタウイルスは、患者便検体からRNAを抽出し電気泳動（PAGE）を行うことで、ウイルスRNAのバンドパターンを解析して流行株の傾向を把握することができる。この解析法について、より簡便かつ再現性の高い手法を確立するため、核酸自動電気泳動装置MultiNA（島津）またはQIAxcel（QIAGEN）を利用できるか否か検討した。結果として、MultiNAでは再現性は高いが分離能が低く、逆にQIAxcelでは分離能は良いが再現性が低いことが明らかとなった。実用稼働させるためには、いずれの装置の場合も改良が必要であると考えられた。

[藤井克樹、村上耕介、デニス・フランシス、芳賀慧、下池貴志、片山和彦]

5. その他

(1) セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチンのD抗原量試験法の確立

大阪大学微生物病研究会のテトラビック、および、化学及血清療法研究所のクアトロバックには免疫賦活剤としてアルミニウムが含まれるので、D抗原量を測定する際、何らかの方法でアルミニウムの影響を除く必要がある。今回の検討で、抗原抗体反応時にEDTAを終濃度50mMを加えることでほぼアルミニウムの影響を回避させることができた。クアトロバックの場合、抗

原抗体反応は通常通り4℃で問題なく結果が得られたが、テトラビックでは抗原抗体反応の温度を25℃で行う必要があった。

[染谷雄一]

(2) 血液製剤のCohnエタノール法による各画分へのHCV混入様式の解明

血漿分画製剤は献血血をCohnエタノール法により分画して製造される。HCVに汚染された第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与による感染事例が報告されて来たが、グロブリン、アルブミン製剤における感染事故はほとんどない。この理由を解明するために実験室レベルのCohnエタノール法を確立し、血漿にHCVを加え、この系を用いてクリオ/脱クリオ分画（C/dC）、更にフィブリノゲン沈殿画分Fとそれ以外の上清Sとに分画した。殆どのHCVはC/dCではdC画分に、F/SではS画分に分画されることが明らかとなった。

[下池貴志、野島清子*、脇田隆字、岡田義昭** *：血液・安全性研究部、**：埼玉医科大学]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

ア) レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2013年度は、エンテロウイルス単味抗血清117本、細胞等21件、ウイルス株6種類を配布した。

[吉田 弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、清水博之]

イ) エンテロウイルス検査実施体制に関する全国アンケート調査

エンテロウイルスレファレンスセンター(全国6ブロック)との協力のもと地方衛生研究所で実施している検査の現状把握を行った。その結果、①エンテロウイルス検査に関する基盤的技術研修コースの企画、関連するマニュアル整備、次いで、②遺伝子解析法支援のためのデータ整備につき、次年度実施可能性につい

て検討してゆくこととした。

[エンテロウイルスレファレンスセンター
福島県衛研（北海道・東北・新潟）
神奈川県衛研（関東・甲信・静）
愛知県衛研（東海・北陸）
神戸市環境研（近畿）
愛媛県衛環研（中国・四国）
福岡県保環研（九州）
ウイルス第二部]

[吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、清水博之]

ウ) 2013年10月17日に実施された平成25年度感染症危機管理研修会において、「ポリオの現状と不活化ポリオワクチン導入後の課題」についての講義を行った。

[清水博之]

エ) 2014年2月20日に実施された平成25年度希少感染症診断技術研修会において、「手足口病の大規模流行と原因ウイルス」についての講義を行った。

[清水博之]

(2) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入後の環境水サーベイランス導入

わが国で2012年9月よりIPV導入に伴い、環境水調査によるポリオウイルスサーベイランスを全国13か所にて2013年春より順次開始した。2013年度は感染症流行予測調査事業(感染源調査)として8か所、調査研究として5か所の協力を得て下水利用総人口約450万人を対象とした調査を行った。2014年3月末日現在、ポリオウイルスは環境水より検出されていない。他方、エンテロウイルス、アデノウイルスは多種類検出されており、①異なる数か所で検出されたもの、②長期間同一地域で検出されたものがあり、広域伝播、或いは地域内伝播の可能性を示唆した。環境水調査で検出されたウイルスの中には感染症発生动向調査では報告されていないウイルス種もみられ、不顕性感染により伝播していることを示唆した。このように環境水調査は高感度にヒト集団のポリオを含む腸管系ウイル

スを検出可能であると考えられる。

[滝澤剛則(富山県衛生研究所)、濱崎光宏(福岡県保健環研)、山崎謙治、中田恵子(大阪府公衛研)、高橋雅輝(岩手県環境研セ)、堀田千恵美(千葉県衛研)、山下育孝(愛媛県衛環研)、筒井理華(青森県環境保セ)、内野清子(堺市衛研)、小澤広規(横浜市衛研)、岩切章(宮崎県衛環研)、神保達也(浜松市保環研)、下野尚悦(和歌山県衛環研セ)、北川和寛(福島県衛研)、葛口剛(岐阜県保環研)、伊藤雅(愛知県衛研)、吉田弘]

(3) ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修(JICA共催)の開催

第23回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第4回目)を実施した。研修期間は2014年1月27日~2月21日、研修参加者は、パプアニューギニア、アフガニスタン、リビア、中華人民共和国から各1名、パキスタン、ベトナム、ガーナ、モザンビーク、ナイジェリア、コンゴ民主共和国から各2名の計16名であった。WHOワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための実習および講義を実施した。また、ポリオ根絶および麻しん排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、脇田隆字]

(4) WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL)としての活動

ア) National Polio Laboratoryが存在しないラオス・カンボジアのNational Polio Laboratoryとして実験室診断を行った。本年度はカンボジア135検体およびラオス84検体のAFP由来糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。

[吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、清水博之]

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア・ベトナム等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。野生株ポリオウイルスおよび VDPV は検出されなかった。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 片岡周子, 中村朋史, 和田純子, 清水博之]

ウ) 2013 年 6 月 25 日－6 月 27 日に WHO 本部(ジュネーブ、スイス)で開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics (6/25, 2014) および The 20th Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network (6/26-27) に WHO 短期専門家として参加し、ポリオウイルス新規検出法について発表し、実験室診断の技術的課題に関する討議を行った。

[清水博之]

エ) 2013 年 10 月 7 日－10 月 9 日に行われた WHO ポリオ実験室査察(WHO accreditation review)に対応し、WHO/HQ および WPRO からの担当者による査察および打合せを実施した。

[清水博之, 吉田弘, 有田峰太郎, 片岡周子, 中村朋史, 和田純子]

オ) 2014 年 2 月 25 日－2 月 27 日に RIVM (Bilthoven, オランダ) において開催された WHO Meeting of the Ad Hoc Small Working Group discussion on improving Polio Laboratory diagnostics 会議に参加し、ポリオウイルス実験室ネットワークの技術的課題についての検討を行った。

[清水博之]

カ) WHO/WPRO の依頼により、以前、韓国 CDC から型内鑑別試験のため送られ、感染研で保管されていたポリオウイルス分離株 30 株について、realtime PCR (ITD および VDPV) を実施し WPRO に報告した。試験結果は韓国 CDC ポリオラボにおける realtime PCR 導入のための精度管理試験に用いられる。

[中村朋史, 片岡周子, 清水博之]

キ) 日本ポリオ根絶会議構成員として、Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status in Japan for the 19th Regional Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication in the Western Pacific ドラフト作成と会議資料作成を担当した。

[清水博之]

(5) 国際協力活動

ア) 2013 年 9 月 5 日－9 月 7 日、National Institute of Hygiene and Epidemiology [NIHE] (ハノイ、ベトナム) において、手足口病実験室診断およびエンテロウイルス 71 (EV71) 分離株の遺伝子解析に関する研究打合せを実施した。

イ) 2013 年 10 月 28 日－10 月 29 日、National Institute of Hygiene and Epidemiology [NIHE] (ハノイ、ベトナム) で開催された NIID-NIHE 共同研究成果報告会において共同研究の研究成果のサマリーを報告した。

[清水博之]

ウ) 2013 年 11 月 24 日－11 月 25 日に中国北京で開催された、第 7 回日中韓感染症予防シンポジウム (11/25) および NIID-CCDC 共同研究会議 (11/26) に参加し、手足口病および EV71 感染症流行の現状と EV71 感染症に関わるウイルス学的研究成果について研究発表を行うとともに、共同研究の進捗状況および今後の研究計画について討議した。

[清水博之]

2. WHO 西太平洋地域の 2013 年のポリオウイルス分離状況

(1) WHO 西太平洋地域のポリオウイルス分離状況

2012 年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の糞便検体 219 検体について、ウイルス

分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。ベトナム、カンボジアにおいて AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。野生株ポリオウイルスは検出されなかった。[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、脇田隆字]

(2) ベトナムで 2012 年に検出された 2 型 VDPV のウイルス学的性状の解析

2012 年 2 月に発症した Soc Trang 省の AFP 患者由来糞便検体からポリオウイルス様分離株が検出され、型内鑑別および塩基配列解析試験の結果、分離株は VP1 領域に 6 個所の塩基置換を有する 2 型 VDPV と同定された。Dong Nai 省の AFP 症例からも、VP1 領域に 5～6 個所の塩基置換を有する 2 型 VDPV 株が分離同定された。2012 年にベトナムの 2 例の急性弛緩性麻痺症例から分離された 2 型 VDPV は、それぞれ、独立した VDPV 孤発例と考えられ、長期にわたり 2 型 VDPV 伝播が継続している可能性は低いことが示唆された。

[清水博之、片岡周子、中村朋史、遠田耕平 (WHO ベトナム)、Nguyen Thi Thanh Thao (パスツール研究所)]

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) 便抽出液検体からのポリオウイルス抽出法の開発

培養細胞を用いないウイルス検出系の開発を目的として、便抽出液中のポリオウイルスを抽出する新規法を開発した。ポリオウイルスレセプター分子を高密度で結合させたナノ磁性ビーズを用いて、便抽出液のような夾雑物を含む臨床検体からでも効率よくポリオウイルスが抽出できることが示された。本方法は、便検体もしくは環境水からポリオウイルスを直接検出するために有用であると考えられる。

[有田峰太郎]

(2) ウイルス受容体特異性を応用した環境水からのポリオウイルス直接検出法の開発

細胞培養を経ず直接かつ高感度に環境中のポリオウ

イルス (PV) を検出・同定する手法 (直接検出法) の検討を行った。陰電荷膜 (NCF) によるウイルス濃縮に PV レセプター結合型磁気ビーズ (PVR-MB) を組み合わせた新規 PV 濃縮法によって PV を濃縮した。抽出した RNA を用いて Poliovirus intratypic differentiation Real-time RT-PCR (rRT-PCR ITD 法) による PV 直接検出が可能か検討を行った。力価既知の PV を溶液に外部添加したモデル実験においては、NCF と PVR-MB を併用することにより添加ウイルスを約 3,500-5,500 倍に濃縮できること、一定の力価を有する PV の直接検出が可能であることが明らかとなった。しかしながら、段階希釈した PV を用いて行った検出限界の比較では、NCF によって濃縮した PV を細胞接種した系 (従来法) が直接検出法よりも優位な場合もあった。新規濃縮法は溶液中の PV を感染性を維持したまま高効率に濃縮できることから、下水流入水や河川水といった環境検体等への応用が期待される結果となったが、rRT-PCR ITD 法を用いた PV 遺伝子の直接検出はさらなる改良が求められる。

[中村朋史、有田峰太郎、清水博之]

(3) 中国山東省にて環境水サーベイランスにて検出された 2 型 VDPV

2008 年以来、中国山東省 CDC と、環境サーベイランス共同研究を行っている。2012 年 12 月に本法により 2 型 VDPV (VP1 で 7 塩基置換) が検出された。VDPV 検出前後、環境水から分離された 2 型ワクチン株とは塩基配列上の類似性は認められず、また AFP サーベイランスより患者からは VDPV が分離されていない。山東省の OPV 接種率は 90%を超えているが、環境サーベイランスは高感度にポリオウイルスを追跡する方法として有用である。

[Tao Zexin (山東省 CDC)、Zhang Yong (中国 CDC)、吉田弘]

(4) ポリオウイルス環境サーベイランスのためのリアルタイム PCR の開発

ポリオ根絶計画では将来的に生ワクチン自身の停止も念頭に入れており、ワクチン株の消失の証明を高感度に行う必要がある。今般、環境水濃縮液より直接、

ポリオワクチン株ウイルスゲノムを検出するためのリアルタイム PCR 法の開発を行った。細胞培養によるウイルス分離法と比較すると 83.3%の一致度であった。分離法は時間を要するため、ワクチン株の簡易スクリーニング法としては利用可能であると考えられる。
[板持雅恵、滝澤剛則（富山県衛研）、吉田弘]

(5) 宿主因子 PI4KB および OSBP family I のポリオウイルス複製における役割の解析

これまでの解析により、ポリオウイルスの複製に必要な宿主細胞内経路としてホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ (PI4KB) /オキシステロール結合タンパク (OSBP) 経路が同定されたが、PI4KB/OSBP 経路がどのようにウイルスの複製を支えているかは謎であった。今回、この経路に関与するウイルスタンパク質を同定し、PI4KB/OSBP 経路のウイルス複製における役割を解析した。その結果、ウイルスタンパク質 2BC/3A/3AB が PI4KB 活性を調整してホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) 産生を促進し、産生された PI4P に OSBP が結合しウイルス感染で誘導された膜上にコレステロールを蓄積することにより、ウイルス複製の場の形成を促進することが示唆された。

[有田峰太郎]

(6) ナイジェリアの 2 型 VDPV の病原性解析

2005-2011 年にかけて分離された 2 型 cVDPV 株の遺伝子解析と分子系統解析によると、ナイジェリアの 2 型 cVDPV は、同一の genetic lineage には属しておらず、異なる genetic lineage が頻繁に消長を繰り返し、そのうち、7 つの genetic lineage が、比較的長期間伝播したことが明らかとなった。異なる genetic lineage に属する代表的 2 型 cVDPV 6 株について、PVR 発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性の解析を行った。解析した 6 株の 2 型 cVDPV のうち 3 株は、野生株と同程度の高い神経病原性を有し、明らかな毒性復帰を示した ($PD_{50}=2.1\sim 2.4$)。これら 3 株と比較すると 11195 株および 11199 株は、若干弱い神経病原性を示したが ($PD_{50}=3.3\sim 3.8$)、親株である Sabin 2

株と比較すると神経病原性は顕著に高かった。C 群エンテロウイルスとの組換えウイルスではない 11200 株の神経病原性は、弱毒 Sabin 2 株と強毒株 MEF-1 株の中間に位置していた ($PD_{50}=5.9$)。

[Cara Burns, Olen Kew (米国 CDC)、Asif Naeem, Rifqiyah Nur Umami、西村順裕、清水博之]

(7) 2 型 VDPV 分離株の中和抗原性解析

ナイジェリアおよびベトナムで分離された 2 型 VDPV 分離株と親株である Sabin 2 型とのアミノ酸配列の比較によると、2 型 VDPV 分離株は、抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、2 型 VDPV 株の中和抗原性の変化について検討した。本試験に用いたヒト血清検体は、日本の健常成人に由来する血清検体で、イモバックスポリオ (conventional IPV; cIPV) 追加接種前後の血清を用いた。1 型と 3 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で違いが認められ、強毒株に対する中和抗体価は、Sabin 株に対する抗体価より低い傾向が認められた。2 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で大きな違いは認められなかった。2 型 VDPV 株に対する中和抗体価も、Sabin 株に対する中和抗体価と、ほぼ同等であり、抗原性の変化は認められなかった。

[福島慎二(東京医大)、中野貴司(川崎医大)、片岡周子、清水博之]

4. 日本におけるポリオフリーの維持に関わる研究

(1) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から 5,000 人の 2 歳児を無作為抽出し、市区町村における予防接種担当者へ、OPV, IPV, DPT-IPV 接種月齢の調査を依頼し、調査票を基に累積接種率を算定した。OPV 累積接種率算定時には、OPV 接種済みで接種日が明らかな標本と未接種標本のみとし、IPV 累積接種率算定時には、IPV 接種済みで接種日が明らかな標本と未接種標本のみとし、接種日不明の標本を除外した。2013 年に調査対象となった 2 歳児における OPV 累積接種率は、1 回目は生後 9 ヶ月以降上昇が止まり、生後 24 ヶ月で約 43%、2 回目は生後 12 ヶ月以

降上昇が止まり、生後 24 ヶ月で約 10%であった。2012 年 9 月 1 日から開始された IPV の 2 回目、3 回目累積接種率は生後 24 ヶ月で 78%以上に達していた。

。[高山直秀 (都立駒込病院)、清水博之]

(2) 成人における IPV 追加接種の安全性と有効性の検討

cIPV接種臨床研究は、倫理委員会の承認を得たうえで、cIPV製剤を健常成人に2回接種し、血中中和抗体価の推移と接種後の有害事象を観察した。1, 2, 3型ポリオウイルス(OPV株、野生株、VDPV株、計10株)に対する血清中和抗体価を測定した。健康成人50名を登録し、49名に対してIPVを2回接種するプロトコルを終了し、42名の血清中和抗体価を測定した。cIPV接種臨床研究の結果、42名の中和抗体価測定が完了し、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV1回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。同一血清中の中和抗体価は、Sabin株と野生型標準株で大きな違いは認められなかった。3型に対する抗体誘導は、他の型よりも少し弱い傾向があった。

[福島慎二(東京医大)、中野貴司(川崎医大)、片岡周子、中村朋史、清水博之]

(3) 不活化ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況および抗体保有状況

2012年9月1日に単独の不活化ポリオワクチン(cIPV)が定期接種に導入され、同年11月1日には4種混合ワクチンが導入された。定期接種に用いるワクチンならびに接種スケジュールが変更され、cIPVあるいはDPT-sIPV(IPV含有ワクチン)の接種回数は、1) OPV未接種者は初回3回、追加1回(合計4回)、2) OPV1回接種者は3回(合計4回)、3) OPV2回接種者は必要なとされた。IPV含有ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況および抗体保有状況について調査した。IPV含有ワクチンが定期接種に導入されたことにより、接種したワクチンの割合は年齢によって異なるが、いずれかのポリオワクチンについて1回以上の接種歴があった者の割合(接種歴不明者を除いた割合)は97

~100%と高く、年齢による差はほとんどみられなかった。中和抗体価1:4以上の抗体保有状況についてみると、1~4歳では1型(95~98%)や2型(94~98%)と比較して3型(70~86%)に対する抗体保有率が低かったが、0歳では1型(98%)、2型(98%)、3型(94%)とも高い抗体保有率であり、血清型による差は小さかった。

[佐藤 弘, 多屋馨子, 大石和徳(感染症疫学センター)、清水博之]

5. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

(1) GenBank データベースにおける EV71 キャプシドアミノ酸の解析

PSGL-1 結合性は VP1-98/145 により規定されていることが示唆されていた。そこで、VP1-98/145 にどのようなアミノ酸が存在しているのか、分離株のシーケンスを元に解析した。GenBank に登録されている VP1-98 および VP1-145 の両方を含む配列を検索したところ、のべ約 1700 株の情報が得られた。VP1-98/145 アミノ酸の組合せは 4 つに大別でき、E/G (約 9%)、E/Q (約 9%)、E/E (約 70%)、K/E (約 9%) となっていた。これらの組合せのうち、E/G および E/Q は PSGL-1 結合性 EV71、E/E および K/E は PSGL-1 非結合性 EV71 と予想されるので、PSGL-1 非結合性 EV71 が GenBank データベース登録株の大部分 (約 80%) を占めると推測された。

[西村順裕、脇田隆字、清水博之]

(2) 蛍光蛋白質を発現する EV71 の作製

EV71 の感染性を簡易に検出するため、蛍光蛋白質 EGFP を発現する EV71-1095 株の作製を試みた。EV71 ゲノムの VP4 領域の末端に、EGFP 遺伝子と 2A プロテアーゼ認識配列を挿入した。ウイルスゲノム RNA を *in vitro* で合成し、RD 細胞にトランスフェクションしたところ、培養上清中に RD 細胞、Jurkat 細胞への感染性をもつウイルスが産生された。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィ

ラデルフィア小児病院)]

(3) NF449 阻害回避変異を導入した EV71-1095 株の作製

低分子化合物 NF449 は、EV71 の RD 細胞への感染を阻害し、その阻害回避 EV71 はキャプシド蛋白質 VP1 の 98 番目と 244 番目のアミノ酸に変異をもつことが報告されている。NF449 と EV71 の結合様式を詳細に解析するため、これら二つのアミノ酸のいずれかまたは両方に変異をもつ EV71-1095 株変異体を作製した。これら EV71-1095 変異体の RD 細胞への感染においては、NF449 阻害作用が低下していることを確認した。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

(4) NF449 による EV71 の RD 細胞結合阻害

S-35 でラベルした EV71-1095 株 (EV71-S35) を作製した。EV71-S35 は RD 細胞表面に結合することを確認した。EV71-S35 を NF449 で前処理したところ、EV71-S35 の細胞表面への結合が濃度依存的に阻害された。したがって、NF449 は EV71 と RD 細胞表面受容体との結合を阻害することが推測された。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

(5) NF449 による EV71 の RD 細胞感染阻害

EGFP を発現する EV71-1095 株 (EV71-EGFP) と RD 細胞を用いた。EV71-EGFP と NF449 を 1 時間反応させ、RD 細胞に感染させた。感染 16 時間後の EGFP の発現は NF449 の濃度に依存して阻害された。したがって、NF449 は EV71 の RD 細胞表面受容体への結合のみならず、感染も阻害することが推測された。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

(6) 単量体の可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質の作製
EV71 と PSGL-1 との結合様式を詳細に解析するため、単量体の可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質の作製を試み

た。マウス IgG2a Fc 領域をコードする cDNA をテンプレートとして、アミノ酸変異を 7 カ所に導入し、二量体化を阻害した。さらに、PSGL-1 の細胞外領域とのキメラとして、可溶性 PSGL-1-Fc モノマー蛋白質を 293T 細胞で作製した。精製蛋白質は二量体のおよそ半分の分子サイズであり、単量体と予想された。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

(7) PSGL-1 結合性 EV71 と非結合性 EV71 のウイルス学的解析

感染性クローンに由来する PSGL-1 結合 (PB 型) 株と PSGL-1 非結合 (non-PB 型) 株をそれぞれ感染動物モデルであるカンクイザルに接種し EV71 の感染・病原性発現機構について比較解析した。PB 型または non-PB 型 EV71 を感染させたカンクイザルの臨床検体 (直腸拭い液や咽頭拭い液、血清、PBMC) 及び剖検採材を用いて CODEHOP-PCR にてウイルスの検出を行い、陽性サンプルでは VP1 全領域のシーケンスを行なった。Non-PB を接種したサル臨床検体からは感染早期にウイルスが高頻度に検出されたが、PB を接種したサルの臨床検体からは感染後期に検出された。また剖検採材からのウイルス検出では non-PB 接種群のリンパ節から高頻度にウイルスが検出され、PB 接種群からは中枢神経組織において高頻度にウイルスが検出された。ほぼ全てのサンプルにおいて non-PB 接種群から検出されたウイルスは VP1 の 98 番目のアミノ酸がリジン (K) からグルタミン酸 (E) に変異していたが表現型は non-PB のままであり、PB 接種群では VP1 の 145 番目のアミノ酸がグリシン (G) からグルタミン酸 (E) に変異し表現型が non-PB に変化していることが分かった。しかし PB を接種したサルから分離した PBMC においては変異していない PB が検出された。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至 (動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代 (感染病理部)]

(8) EV71 感染カンクイザルの免疫学的解析

EV71 感染カニクイザルの血清中における 28 種類のサイトカイン量を測定した。IL-1b は PB 接種群及び non-PB 接種群どちらのサルにおいても感染 3 日目から上昇していた。その他のサイトカインは non-PB 接種群において優位に上昇していたが、PB 接種群はほとんど上昇や減少などの変化はみられなかった。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

(9) 北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

2011-2012 年にベトナム全土で多くの死亡例を含む大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。そこで 2011 年と 2012 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行った。2011 と 2012 年エンテロウイルス陽性検体のうち約半数の検体でエンテロウイルス 71 (EV71) が検出され、次いでコクサッキー A6 型 (CA6) が約 25%、A16 (CA16) が 15% でその他のエンテロウイルスが約 10% であった。2012 年では EV71 の検出頻度が 2011 年に比べて増加し (2011 年: 約 50%、2012 年: 約 62%)、CA6 は減少した (2011 年: 約 30%、2012 年: 約 22%)。また EV71 の分離株の分子疫学的解析を VP1 領域の配列で行ったところ、どちらの年においても遺伝子型 C4 が高頻度に検出され、次いで B5、C5 の頻度で検出された。

[片岡周子、中村朋史、清水博之、Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)、]

(10) 手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で 900 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。中国 CDC および感染研ウイルス第

二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、中国で伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、ほとんどの EV71 分離株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。遺伝子型 C4 は 1998-2013 年にかけて検出されているが、より詳細には C4b (1998-2004 年) C4a (2003-2012 年) に分類される。中国本土で検出される EV71 株のほとんどすべてが遺伝子型 C4 である点は、中国および東アジア地域における EV71 ワクチン開発にとって重要な疫学的特徴と考えられる。

[Zhang Yong, Xu Wenbo (中国 CDC)、清水博之]

(11) コクサッキーウイルス A6 型による手足口病流行

2011 年、感染症発生動向調査開始以来最大規模の手足口病流行が発生し、主要な原因ウイルスはコクサッキーウイルス A6 型 (CVA6) および A16 型であった。2011 年の手足口病流行時には、四肢末端だけでなく大腿部や臀部にも発疹を呈する手足口病非典型例が報告され、また、爪甲脱落症を呈する症例が認められた。2011 年に検出された CVA6 について分子疫学的解析を行った結果、2011 年流行株の VP1 遺伝子は、2008 年フィンランドの手足口病症例から検出された CVA6 株との相同性が高いことが示された。CVA6 は、我が国では従来、他のコクサッキー A 群ウイルスとともに、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったが、2008 年以降、手足口病症例からの検出が増加し、2011 年の大規模な手足口病の主要な原因ウイルスとなった。手足口病および爪甲脱落症の発症に関与する最近の CVA6 と、従来、ヘルパンギーナ発症に関与していた CVA6 は、異なる病原性を有することが示唆される。

[藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

(12) RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離

手足口病、ヘルパンギーナの原因ウイルスである HEV-A に分類されるウイルスの多くは培養細胞での分離が困難であり、従来、主に乳のみマウス (SM) を用いた分離が行われていた。また、近年は PCR 法等の遺伝

子検査による検出が広く行われているが、塩基配列の決定等コストがかかる上、流行株の抗原性等の情報が見られない。2011年に発生した Coxsackie virus A6 (CVA6) による HFMD の大流行に際し、RD-A 細胞を用いて CVA6 を分離同定した。HEV-A サーベイランスへの RD-A 細胞の有効性を検討することを目的に、RD-A 細胞の HEV-A 分離効率を検討した。臨床検体からの分離は CVA2~5、8、10 では SM とほぼ同等、CVA6、12、16、EV71 は分離可能であるが、分離率は従来法の 1/4~1/2 であった。CVA14 は分離できなかった。RD-A 細胞は SM に比較すると検出感度はやや劣るものの、CVA14 を除く国内でヘルパンギーナ、手足口病の原因ウイルスとなっている HEV-A の分離が可能であり、病原体サーベイランスに有効であると考えられた。

[飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)、清水博之]

(13) 中国広東省広州市におけるエンテロウイルスの環境サーベイランス研究

広州市下水処理場を定点として、2008年よりポリオ/エンテロウイルスを対象とした環境サーベイランスの共同研究を行っている。今般、2009-2012年の調査結果を集計したところ、HEV-B群に属する17血清型が検出され、E11、E6、E7、E12、CB5、CB3の検出頻度が高いことを示した。CB5は09-10年、CB3は11-12年のみ検出されたが、E11、E6、E7、E12は09-12年の4年間に各々異なる周期で検出されている。定点サーベイランスシステムを有さない地域において環境サーベイランスはエンテロウイルスの疫学を理解するのに有効と考えられる。

[Zheng Huanying (広東省 CDC)、Zhang Yong (中国 CDC)、吉田弘]

(14) コクサッキーB群ウイルスの腫瘍溶解性の検討

近年ウイルス自身が本来有する腫瘍溶解性を利用した、腫瘍溶解ウイルス療法が注目されてきており、腫瘍溶解性アデノウイルスもしくは単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が進められている。新たな腫瘍溶解ウイルス療法の開発を目的に、RNAウイルスである

ピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に着目して、これまでに28種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株及び腎臓、肺および骨髄ストローマ正常細胞に *in vitro* で感染させ、それらの抗腫瘍効果について比較検討した。その結果、コクサッキーウイルス B3型 (CVB3) が、正常肺線維芽細胞を障害することなく、低い感染力価によっても肺癌細胞を特異的に溶解することを発見した。CVB3による抗腫瘍活性は受容体 (CAR および DAF) 依存性であった。CVB3による特異的抗腫瘍活性はマウス担癌モデルにおいても示されたことから、新たな腫瘍溶解性ウイルス療法としての応用が期待できる。

[宮本将平、井上博之、谷憲三郎 (九州大学)、清水博之]

(15) Saffold virus 全遺伝子によるゲノム遺伝子組換え解析

パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者由来糞便 943 検体から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し、遺伝子解析を行ったところ、71 検体が SAFV 陽性であり、新たに同定された3つの遺伝子型を含む多様な遺伝子型 (11 genotypes) の Saffold virus の存在が明らかとなった。すべての遺伝子型の代表株について、全ゲノム遺伝子解析を行ったところ、Saffold virus 非カプシド領域において頻繁かつ広範に遺伝子組換えが起きていることが示唆された。一方、齧歯類を宿主とするカルジオウイルスと Saffold virus 間の遺伝子組換えの可能性は低く、Saffold virus は従来のカルジオウイルスとは固有のヒトカルジオウイルスとして、独立したウイルス種 (species) に分類されることが示唆された。

[Naeem Asif、清水博之]

(16) 日本の小児急性胃腸炎患者から検出されたヒトコサウイルスの解析

ヒトコサウイルス (HCoV) はピコルナウイルス科に属し、急性胃腸炎の小児から検出されているが、他のウイルスとの重感染が多い。今回、日本の小児科外来を受診した急性胃腸炎の小児から HCoV の検出を行った。

1 例 (10928 株) が HCoV 陽性であった。この検体では上記の他の 12 種類のウイルスは検出されなかった。この患児は月齢 6 ヶ月で、その下痢症状は重症であったが、発熱、嘔吐、上気道炎症状はなかった。この株について全塩基配列の解析を行った。その結果この株は HCoV A 種に属し、組み換え体であることがわかった。

[沖津祥子、牛島廣治 (日本大学医学部)、清水博之]

(17) 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究

新規ヒトカルジオウイルス SAFV の神経および脾臓に対する病原性に注目し、神経疾患患者の末梢血単核球を対象にしたウイルス遺伝子の検出、および I 型糖尿病、剖検例のパラフィン包埋脾臓組織切片を用いたウイルス抗原の検出を行った。SAFV の遺伝子・抗原が検出され、ウイルス持続感染の可能性が示された。持続感染細胞の解析により SAFV 持続感染は受容体発現密度に依存した維持型持続感染であることを明らかにした。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(18) ウイルス性髄膜炎の病理学的診断法に関する研究

髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標本を作製し、免疫組織化学法による各種抗体の交差反応性について検討し、ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片における SAFV3 および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。抗 SAFV 抗体は特異性を示し、エンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性は示さなかった。抗 EV71 抗体はエンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性を示した。抗 PV 抗体はいずれのウイルスにも交差反応性を示さなかった。抗 CVB3 抗体はエンテロウイルス A, B 型に交差反応性を示した。抗 EV-2C 抗体は SAFV 以外のエンテロウイルス抗原を検出することが可能であった。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(19) コクサッキーウイルス B2 型垂直感染による新生児重症感染例

コクサッキーウイルス B (CVB) は主に夏季に流行し、感冒様症状のほか、心筋炎や無菌性髄膜炎を合併することがあり、新生児には重篤な全身感染病態を起こすこともある。CVB2 周産期垂直感染が疑われた症例 1 ではすべての検体から同一塩基配列を有する CVB2 遺伝子が検出された。心筋、髄液等から遺伝子検索結果と同じ CVB2 が分離された。特に、心筋組織から大量の CVB2 が回収され、免疫染色でも確認ことから CVB2 による心筋炎が直接の死因であると思われた。症例 2 においても母児全ての検体から同一塩基配列を有する CVB2 が検出されたことから、本症例も CVB2 の垂直感染であることが強く示唆された。以上のことから、周産期の CVB2 感染は新生児に重篤な感染をもたらす可能性があり、注意を要するものと思われる。

[吾郷 昌信 (長崎県環境保健研究センター)、清水博之]

6. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有状況

世界的ポリオ根絶達成およびその後の OPV 接種停止を視野に入れ、WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを、すべての加盟国に求めている。我が国では、西太平洋地域における野生株ポリオウイルス伝播の終息を受け、2000-2002 年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが、調査票の全体的な回収率が低く、調査精度とその後のフォローアップに関する多くの問題点が指摘されていた。2000-2008 年における各種の野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を、厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで、所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し、野生

株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した。保有施設リストを含む野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書を WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出し、2008 年 12 月、WHO 西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了した。その後、WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会からの勧奨に基づき、ポリオウイルス保有施設リストのアップデートを継続している。

[清水博之]

(2) WHO ポリオ実験室ネットワーク DVD を用いたバイオセーフティ教育訓練

WHO本部ポリオ実験室ネットワーク事務局で作成したポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用DVDを、外国人研修生に対するバイオセーフティ教育訓練に使用した。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、実験室のバイオセーフティ、機器の維持管理、バイオセーフティ以外の実験室安全管理、実験室のアレンジメント等、実験室・検査室の運用・安全管理・教育訓練に関する具体的な事例が取り上げられており、病原体を取扱う実験室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓練資料である。地方衛生研究所スタッフを対象とした国内研修、および、外国人研修生を対象としたJICA集団研修において、WHOバイオセーフティ教育訓練用DVDを用いたバイオセーフティ教育訓練を実施した。WHOバイオセーフティ教育訓練用DVDは、バイオセーフティを中心とした実験室安全管理、実験室のアレンジメント、等多様な事例が具体的に取り上げられており、地方衛生研究所スタッフを対象としたアンケートでも、有用な教材であるとの意見が多かった。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、国際的に標準化されたバイオセーフティ教育訓練資料のひとつとして、ポリオ実験室のみならず、臨床検体や病原体を取扱う国内外の実験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

[伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

7. その他

平成 25 年度は 1 件の行政検査依頼があり、型内株

鑑別試験等を実施した。型内鑑別試験を行ったポリオウイルスはワクチン株と同定された。

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

(1) 2012 年の A 型肝炎流行の疫学的解析

2012 年は現在までに 28 株の解析を行った。IA が 21 株、IB が 2 株、IIIA が 4 株、IIIB が 1 株であった。野田市で発生した家族内感染では 6 人が発症しているが、日本に常在する IA 株 (IA-1) によると考えられる。2010 年に multi-location outbreak の主な原因となった東南アジア由来と考えられる株 (IA-2) は、2011 年には静岡県で 1 例報告されたのみ (他に類似配列が佐賀県で 2 例報告されている) で、2012 年には見つかっていないことから、日本に定着せずにはぼ消失したものと考えられる。

[石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、*島田智恵、*中村奈緒美、*多田有希、**野田 衛、脇田隆字 (*感染症情報センター、**国立衛研食品衛生管理部)、他 26 地方衛生研究所との共同研究]

(2) フィリピン河川水からの HAV の検出

日本において 2010 年に発生した流行の主要な原因は genotype IA であったが、系統樹解析の結果から、従来から日本に常在する株のクラスターとは異なり、フィリピンなど東南アジア由来の株との関連が示唆されていた。フィリピンの熱帯医学研究所、東北大学と共同でフィリピンのマニラ市内の河川 6ヶ所から水を採取して濃縮し、HAV 遺伝子の増幅を行ったところ、6ヶ所すべてから HAV 遺伝子が検出され、市内にウイルスが常在していることが明らかとなった。検出された HAV 株はすべて genotype IA であり、系統樹解析の結果さらに 3つのサブクラスター (S1~S3) に分類されると考えられる。そのうちの 1つは日本で 2010 年に流行した株のクラスターと一致すると考えられた。

[石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、齋藤麻理子*、押谷 仁*、**Socorro P. Lupisan、脇田隆字 (*東北大学、**フィリピン RITM)]

(3) A型肝炎ウイルス(HAV)増殖における宿主細胞タンパク La の影響について。

A型肝炎治療薬開発の一環として、HAV 増殖における La の作用機序を調べるため La 発現阻害作用を持つ化合物 SD-1029 と AG490 存在下の HAV 増殖を検討した。HAV 増殖は AG490 存在下でやや阻害されるものの、化合物非存在下と有意差は認められなかった。少なくとも HAV-Genotype IIIB-strain による GL37 細胞内での HAV 抗原産生に対する La の影響は抗原 ELISA では検出されなかった。

[清原知子、神田達郎(千葉大学)、石井孝司、脇田隆字]

(4) 参照A型肝炎ワクチンの更新

参照A型肝炎ワクチン Lot. P1 の在庫が少なくなったので次期参照ワクチン候補品(乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン「エイムゲン(化血研) HA30) の値付けを実施した。当室、化血研で力価試験 (*in vivo*, *in vitro*) をそれぞれ3回繰り返し、6回分のデータを加重平均して値を決めた。次期参照ワクチン候補品の現行参照ワクチン Lot. P1 に対する *in vivo*, *in vitro* 相対力価はそれぞれ 1.6 参照単位/vial、0.999 参照単位/vial であった。どちらも使用に十分な濃度で有り、この次期参照ワクチン候補品を次期参照A型肝炎ワクチン Lot. P2 として業務委員会、検定協議会に報告、承認された(平成25年12月5日)。

[清原知子、佐藤知子、李天成、塩田智之、吉崎佐矢香、石井孝司、落合雅樹(品質保証・管理室)、脇田隆字]

2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) 培養細胞でのHBV複製評価系の構築

HBV の 1.4 倍長ゲノムを持つ発現プラスミドを構築し、培養細胞に一過性導入を行うことで HBV の複製を評価する系を構築した。HBV core particle に内包される HBV ゲノムを抽出し、real-time PCR 法にて HBV DNA 量を評価する事によりサザンブロット法と相関す

る結果が得られた。このシステムにより HBV の増殖や薬剤感受性等を簡便に評価することが出来ると考えられた。

[山田典栄、杉山隆一、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣]

(2) B型慢性肝炎に対する核酸アナログ感受性の評価

HBV1.4 倍長の HBV コンストラクトを用い、培養細胞に導入後核酸アナログを投与し、その感受性の評価を行った。培養細胞内の core 粒子に含まれる HBV DNA を抽出し real-time PCR 法により HBV DNA を測定した。その結果、容量依存的な複製の阻害が観察され、その結果はサザンブロット法により評価した結果と同様であった。を

[山田典栄、杉山隆一、四柳宏(東京大学)、脇田隆字、加藤孝宣]

(3) B型慢性肝炎におけるエンテカビル耐性症例の検討

エンテカビル投与中に HBV DNA が再上昇した症例の患者血清より HBV 株を分離し塩基配列を確認した。得られた HBV 株には既報のエンテカビル耐性変異は認めず、ラミブジン耐性として知られる rtV173L, rtL180M, rtM204V の変異を認めた。これらの変異を有する株と変異を持たないコンセンサス株をもとに 1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し培養細胞に導入し real-time PCR 法およびサザンブロット法にてエンテカビル感受性の評価を行った。これらの変異を有する株はコンセンサス株と比較し、エンテカビル感受性が不良でありこれらの変異はラミブジンのみならずエンテカビルにも耐性であることが明らかとなった。

[山田典栄、杉山隆一、四柳宏(東京大学)、脇田隆字、加藤孝宣]

(4) B型慢性肝炎におけるエンテカビル反応不良症例の検討

エンテカビル投与中も HBV DNA が陰性化しない反応不良症例の患者血清より HBV 株を分離し塩基配列を確

認した。得られた HBV 株には既報の核酸アナログ耐性変異は認めず，rtI122L，rtN123H の変異を認めた。これらの変異を有する株と変異を持たないコンセンサス株をもとに 1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し，培養細胞に導入し real-time PCR 法とサザンブロット法にてエンテカビル感受性の評価を行った。rtI122L，rtN123H の変異を有する株は変異を持たない株より複製効率が高く，この複製効率の差がエンテカビル反応性に関与している可能性が示唆された。

[山田典栄，杉山隆一，四柳宏（東京大学），脇田隆字，加藤孝宣]

(5) B 型慢性肝炎におけるエンテカビル治療中一過性 HBV DNA 上昇症例の検討

エンテカビル投与中に HBV DNA が一度陰性化したが一過性に上昇しその後自然の経過で陰性化した症例の患者血清より HBV 株を分離し塩基配列を確認した。得られた HBV 株には既報の核酸アナログ耐性変異は認めず，rtV191I の変異を認めた。これらの変異を有する株と変異を持たないコンセンサス株をもとに 1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し，培養細胞に導入し RTD-PCR およびサザンブロット法にてエンテカビル感受性の評価を行った。rtV191I の変異を有するウイルスは変異を持たないウイルスより複製効率が高く，この差がエンテカビル投与中の HBV DNA 一過性上昇に関与している可能性が示唆された。

[山田典栄，杉山隆一，四柳宏（東京大学），脇田隆字，加藤孝宣]

(6) HBV genotype H による B 型急性肝炎症例の解析

B 型肝炎では成人での急性肝炎症例でも慢性化する症例が 10-20%程度認められる。そこで，B 型急性肝炎後に 18 か月以上 HBV DNA が陰性化しない慢性化症例から HBV DNA を抽出し，その塩基配列について検討を行った。その患者から得られた HBV 株は報告例が極めて少ない genotype H であった。この患者から得られた配列を元に genotype H 株の 1.4 倍長 HBV ゲノムを持つコンストラクトを構築した。このコンストラク

トを培養細胞に導入する事により HBV の複製が確認された。今後，この株を用いて B 型急性肝炎の慢性化機序等の病態解析が可能であると考えられた。

[山田典栄，杉山隆一，奥瀬千晃（聖マリアンナ医大），四柳宏（東京大学），脇田隆字，加藤孝宣]

(7) B 型急性肝炎症例における HBs 領域のアミノ酸変異の検討

B 型急性肝炎症例の中和エピトープとなる S 領域のアミノ酸変異を検討した。S 領域全体 (aa 1-227) では 91 例中 19 例 (20.9%)，hydrophilic region (aa 110-160) では 9 例 (9.9%)，a determinant 領域 (aa 124-147) では 6 例 (6.6%) に変異を認めた。得られた変異を持つ HBs 抗原発現コンストラクトを作製し，これらの変異が HBs 抗原測定系に与える影響を検討している。

[山田典栄，杉山隆一，四柳宏（東京大学），脇田隆字，加藤孝宣]

(8) 首都圏における B 型急性肝炎の疫学調査

B 型急性肝炎は若年者を中心に性行為感染症として問題となっており，2006 年以降，欧米型である genotype A が増加し約 70%となった。2010 年以降の genotype の分布を調査したところ genotype A が約 45%に減少し，減少傾向であった genotype C が約 35%に上昇した。2010 年に genotype E，2012 年に genotype H という本邦ではまれである genotype による B 型急性肝炎を 1 例ずつ認めた。

[山田典栄，鈴木通博（聖マリアンナ医大），四柳宏（東京大学），脇田隆字，加藤孝宣]

(9) 人工ヌクレアーゼ TALEN による HBV 複製抑制効果の検討

ゲノム改変ツールとして開発された人工ヌクレアーゼである TALEN を用い，HBV cccDNA を標的として HBV 特異的 TALEN を設計し HBV 複製抑制効果を検討した。HepG2 細胞に HBV 発現プラスミド及び TALEN 発現プラスミドをコトランスフェクションし，サザンブロット

及び real-time PCR により評価した結果, TALEN により HBV 複製の抑制が確認できた.

[杉山隆一, 山田典栄, 杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(10) HBV 遺伝子型が宿主細胞のアポトーシスに与える影響の解析

HBV 各種 genotype の株の全長を発現する 1.4 倍長の HBV コンストラクトを HepG2 細胞に導入し, TNF- α 刺激によるアポトーシス誘導に与える影響を解析した. その結果, genotype B 株の導入によりもっとも強くアポトーシスが誘導され, この株の感染は宿主細胞に pro-apoptotic な作用を及ぼしていると考えられた. この genotype B 株に precore stop を導入し, HBe 抗原が生成されないコンストラクトの導入では, アポトーシスが誘導能は減弱しており, HBe 抗原がこの genotype B 株のアポトーシス誘導に関与していると考えられた.

[杉山奈央, 山田典栄, 杉山隆一, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(11) Interferon independent suppression of HBV life cycle by TSSK2 Kinase.

Protein kinases are key regulators of cell function. By adding phosphate groups to substrate proteins, they direct the overall function of many proteins. We performed a functional screening analysis using siRNA library targeting 501 human kinase gene. The effect of knocking down these kinases on HBV replication is studied. One of the identified hits is TSSK2 protein Kinase. We found that TSSK2 is expressed in many hepatocyte cell lines and primary liver cells. TSSK2 kinase suppress HBV replication in many hepatocyte cell lines, including cells that lack the expression of interferon receptors, suggesting the suppression is independent of interferon function. Further analysis is now undergoing to discover the

detailed mechanism of this phenomenon.

[Hussein H Aly, Kazuaki Chayama (Hiroshima Univ.), Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(12) Screening of Human Helicases regulating HBV cccDNA formation.

Human helicases play important role in HBV-DNA repair to form cccDNA. Using shRNA library targeting 136 human helicase genes, we performed a functional assay and monitoring its effect on HBV replication in Hep38.7-Tet cells. The effect of knocking down these Helicases on HBV replication is studied. We identified several helicases required for HBV-cccDNA formation. One of these helicases is RecqL helicase. RecqL helicase is a member of the RecQ DNA helicase family. DNA helicases are enzymes involved in various types of DNA repair, including mismatch repair, nucleotide excision repair and direct repair. Using CHIP assay, we found the direct interaction between RecqL helicase and HBV-cccDNA. Further mechanistic analysis is proceeding to be able to finally develop efficient anti-HBV therapy.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(13) Screening of G coupled receptors that affect HBV life replication.

The G coupled protein receptors constitute a large protein family of receptors that sense molecules outside the cell and activate inside signal transduction pathways and, ultimately, cellular responses. G protein-coupled receptors are involved in many diseases, and are also the target of approximately 40% of all modern medicinal drugs. In a trial to find possible therapeutic targets for HBV replicaUsing siRNA library targeting human G receptors, we screened

for those affecting HBV replication in 38.7 cells. Targets were identified, and further analysis is undergoing.

[Hossam Geweid, Hussein Hassan Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(14) IL-1beta, TNF-alpha による宿主内 HBV 自然免疫活性化機序の解析

HepaRG 細胞を用いた HBV 感染評価系を用いることにより、IL-1beta, TNF-alpha の前処理によって宿主細胞の HBV 感染感受性が低下することが判明した。これは宿主デアミナーゼである AID の発現上昇、AID による HBV 排除効果を介していることが示唆された。

[渡士幸一, 脇田隆字]

(15) HBV 侵入を阻害するシクロスポリンの抗 HBV 作用機序の解析

HepaRG 細胞での HBV 感染評価系を用いた化合物スクリーニングにより、シクロスポリンが HBV 感染を阻害することが明らかとなった。またこれは感染受容体である NTCP とエンベロープである LHBs の結合を阻害することによると示唆された。

[渡士幸一, 松永智子 (横浜市立大), 梁明秀 (横浜市立大), 岩本将士, 九十田千子, 脇田隆字]

(16) 高効率 HBV 複製細胞系を用いた抗 HBV 化合物の解析

単一細胞クローニング法により、HBV を恒常的に産生する細胞株 HepG2. 2. 15. 7 細胞を、また tet-off 細胞株 Hep38. 7-Tet 細胞を樹立した。HepG2. 2. 15. 7 細胞および Hep38. 7-Tet 細胞は親株に比較して核酸アナログに高感受性であることが明らかとなった。Hep38. 7-Tet 細胞を用いた化合物スクリーニングにより HBV 複製を阻害する核酸アナログ以外の化合物を同定した。

[渡士幸一, 岩本将士, 脇田隆字]

(17) 新規 HBV 感染許容性細胞の樹立

HepG2 細胞に HBV 感染受容体である NTCP を過剰発現する細胞株をクローン化することにより、HBV 高感受性の細胞株を樹立した。この細胞の約 20% の細胞は HBV 感染陽性となったが、感染前に 3% DMSO で前処理した細胞においては感染率が約 50% 程度にまで増加した。

[岩本将士, 渡士幸一, 脇田隆字]

(18) HBV 感染感受性を低下させる Ro41-5253 の作用機序の解析

Ro41-5253 の前処理により細胞の HBV 感染感受性が低下することを見出した。この作用機序を解析したところ、Ro41-5253 は NTCP タンパク質および mRNA 発現を低下させることが明らかとなった。

[九十田千子, 渡士幸一, 岩本将士, 脇田隆字]

(19) 遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析

HBV の Large S タンパク質で構成される遺伝子組換え酵母由来 HBV 様粒子 (BNC) が結合する細胞と結合しない細胞を用い、発現量の異なる表面タンパク質を SILAC 法で同定した。同定されたタンパク質に対する siRNA を BNC が結合する細胞に導入し、ノックダウンにより結合能が低下する遺伝子の探索を行った。その結果、HBV の肝細胞表面への結合に関する新規候補因子を同定した。

[松田麻未, 鈴木亮介, 嵯峨涼平, 黒田俊一 (名古屋大), 岡本徹 (阪大微研), 松浦善治 (阪大微研), 脇田隆字]

(20) NCTP 以外の entry に関する宿主因子の同定

最近、HBV の entry に関する因子として HBV preS1 と結合する NTCP が発見された。一方、HBV S 領域を標的とする酵母で作製した B 型肝炎ウイルスワクチンは抗体獲得率 95% (40 歳) で、HBV 感染防御効果も大変高いことが知られている。また、preS1 領域が欠損した HBV の存在が多く報告されており、このようなウイルス感染者からも肝癌発症が報告されている。実際、NTCP 発現 HepG2 細胞を樹立し、HBV を感染させたところ

ろ、感染効率は約 50%で、感染しない細胞群が存在した。そこで、我々は NCTP 以外の entry 因子を同定するため、HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを細胞に導入することで、生きたまま HBV 感染 HepG2-NCTP 細胞と非感染細胞の分別を行った。現在、2 種類の細胞の HBV 感受性の比較を行っている。

[藤本陽, 相崎英樹, 脇田隆字]

(21) B型肝炎の既往歴調査

B型肝炎の疫学調査の一環として、10 代、20 代、30 代の B型肝炎既往歴の調査を行った。所内血清銀行の保存検体を対象とし、既往歴のマーカーである HBc 抗体の検査はエンザイグノスト Anti-HBc monoclonal (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) を使用した。検体の年齢分布は 10 代、20 代、30 代各 200 検体合計 600 検体、男女比は 260 : 340、検体採取時期は 2010 年と 2011 年、地域分布は 12 県であった。HBc 抗体陽性は 15 検体 (2.5%) で日本赤十字社献血者の HBc 抗体陽性率 0.5% より高い結果となった。年齢別に見ると 10 代 4 人、20 代 1 人、30 代 10 人であった。また、陽性 15 検体中 9 検体が九州地方に偏っていた。これまで考えられていたよりも B型肝炎の流行には地域差があり、10 代でも感染歴があることが明らかとなった。今後の B型肝炎対策として、地域差、小児期の水平感染を考慮する必要がある。

[清原知子、石井孝司、脇田隆字]

(22) B型肝炎ワクチン「ビームゲン (化血研)」の販売名変更に伴う検定業務の取扱いについて

化学及血清療法研究所は医療事故防止目的のため、これまで同一製剤 (ビームゲン) の分注区分の位置づけであった成人用と小児用の製品を、異なる容量規格の製剤「ビームゲン注0.25ml」、「ビームゲン注0.5ml」として販売名変更代替新規申請し承認される運びとなった。原則として、自家試験、SLP作製、国家検定は承認書別各製剤について実施されるが、今回承認される2製剤は分注日、容量以外は同一製剤として製造されるため、検定の効率化、動物愛護を鑑み、自家試験、国家

検定、SLP記載内容を検定係、品質保証室と協議した。協議に際しては他の製剤との整合性も考慮した。協議の結果、検定申請、受付、判定結果は従来通り検定申請書の「医薬品の名称」単位とし、SLP記載内容は重複部分については省略可能、力価試験は従来通り同一製剤の代表分注区分のみで実施とすることとした。最終的な変更内容については監視指導・麻薬対策課に確認をとり了承された。

[清原知子、石井孝司、検定係、品質保証・管理部第2室]

(23) 増殖効率の向上したウイルス感染系及びモニターの簡便な評価系の構築

HBe 抗原陽性無症候性キャリアの HBV 感染患者 3 名 (Patient : 78 (genotype A)、Patient : 70595 (genotype B)、Patient : 2 (genotype C)) の血清からクローニングされた HBV 遺伝子配列を用いて、テトラサイクリン誘導患者 HBV 発現プラスミドを作製し、HepG2 細胞にプラスミドを導入、HBV 安定発現細胞を構築した。Tet-On 系では genotype B の 1 クローンで、Tet-Off 系では genotype C の 1 クローンで顕著な HBeAg 分泌クローン細胞を取得した。さらに、genotype C のクローン細胞は細胞内 cccDNA 量、細胞外 HBeAg 分泌量が経時的に増加し、cccDNA 合成阻害剤 CCC-0975 の抗 HBV 活性は文献と同等であった。

[小倉直樹 (JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

(24) 抗ウイルス薬の標的候補分子の同定

テトラサイクリン誘導 HBV 発現細胞の HepAD38 細胞 (genotype D) からサブクローニングされた Hep38.7-Tet 細胞を用いて、細胞外 HBeAg 量を指標に 3 種類の siRNA Library (DNA damage response、Epigenetic、Nucleic Acid Binding) のスクリーニングを実施した。HBeAg 分泌阻害を示した 80 遺伝子を primary hits として選抜した。さらに再現性評価として、HBeAg 分泌阻害及び cccDNA 合成阻害を示した 21 遺伝子を second hits として選抜した。

[小倉直樹 (JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

3. C型肝炎ウイルスの研究

(1) ビタミン D により誘導される抗菌ペプチド LL-37 の抗 HCV 作用の解析

ビタミン D により免疫担当細胞において誘導される抗菌ペプチドによる抗 HCV 作用の検討を行った。抗菌ペプチドとして知られている LL-37 を培養細胞に前処理する事により、HCV の感染増殖は著明に抑制された。この抗菌ペプチドの HCV ライフサイクルに与える影響を詳細に検討した結果、LL-37 は HCV の感染性粒子を破壊する事でその感染を阻害している可能性が考えられた。

[松村卓哉(昭和大), 井廻道夫(新百合ヶ丘総合病院), 椎名正明(新百合ヶ丘総合病院), 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(2) Monocyte におけるビタミン D による LL-37 誘導能の解析

マクロファージ様の形質をもつヒト培養細胞である U937 細胞と THP-1 細胞を用い、抗菌ペプチドである LL-37 のビタミン D による誘導について検討を行った。U937 細胞と THP-1 細胞を PMA と活性型ビタミン D であるカルシトリオールで刺激し、LL-37 の mRNA の誘導を Gene Expression で、LL-37 の誘導を ELISA 法で評価した。その結果、両細胞で LL-37 の mRNA は十分な誘導を認めたが、培養上清中の LL-37 濃度は 4 - 7 ng/mL であり、抗 HCV 作用を示す程度までの上昇は認められなかった。

[松村卓哉(昭和大), 井廻道夫(新百合ヶ丘総合病院), 椎名正明(新百合ヶ丘総合病院), 山田典栄, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(3) HuH-7 細胞以外の培養細胞における HCV 複製の検討

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、HuGK-14 細胞, MRC-5 細胞, Vero 細胞, MDCK 細胞, CHO 細胞, 非がん細胞として HEK293 細胞を検討した。それぞれの細胞に全長 HCV RNA を導入したが、いずれの

細胞でも HCV の複製は観察されなかった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(4) HCV ライフサイクルに重要な宿主因子発現量の比較

HCV 複製できない培養細胞において HCV ライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を測定した。HCV 複製に重要な miR-122 は HuGK-14 細胞では Huh-7.5.1 細胞と同レベルの発現が見られたが、その他の細胞ではいずれもほとんど発現していなかった。さらに、HuGK-14 細胞では複製に関わる CKB, 粒子形成に関わる ApoE, cPLA2 の発現量が Huh-7.5.1 と比べて低かった。MRC-5 細胞では Entry に関わる Claudin-1, 複製に関わる CKB, 粒子形成に関わる ApoE の発現量が低かった。HEK293 細胞では、Entry に関わる Claudin-1, 粒子形成に関わる ApoE の発現量が低かった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(5) miR-122 を強制発現させた細胞における HCV 複製の検討

HCV 複製できない培養細胞においてレンチウイルスを用いて各細胞に miR-122 を強制発現させたところ、いずれの細胞でも Huh-7.5.1 細胞と同程度の miR-122 の発現量が得られた。miR-122 を強制発現させた HEK293 細胞では、HCV RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は時間経過とともに上昇することから、HCV 複製は可能であったが、複製効率は Huh-7.5.1 細胞の 1/100 程度であった。また、miR-122 を強制発現させた Vero 細胞では、時間経過とともに細胞内コア抗原量がわずかに上昇した。しかし、その他の細胞では、miR-122 を強制発現させても、HCV 複製は認められなかった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) miR-122, ApoE, Claudin-1 を発現する HEK293 細胞での HCV ライフサイクルの検討

レンチウイルスを用いて miR-122, ApoE, Claudin-1 を発現する HEK293 細胞を作製した。miR-122, ApoE,

Claudin-1 の発現量がすべて Huh-7.5.1 細胞と同等もしくはそれ以上の細胞株を選択し、HCV RNA を導入した。その結果、細胞内コア抗原量は Huh-7.5.1 細胞の 1/5 程度であり、培養上清中のコア抗原量は 1/1000 程度であった。しかし、この培養上清は、感染性を示した。また、Claudin-1 の発現により、HCV 感染が可能となった。以上の結果から、HEK293 細胞では miR-122, Claudin-1, ApoE を発現させることにより、感染、HCV 複製、ウイルス産生といった HCV ライフサイクルのすべてのステップを再現できた。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(7) 培養細胞における ISG 誘導能の検討

HEK293 細胞, MRC-5 細胞, Vero 細胞, Huh-7.5.1 細胞に HCV RNA または poly IC を導入し、細胞内の ISG の発現量を測定した結果、Huh-7.5.1 細胞では、poly IC 導入細胞では ISG の誘導が見られたが、HCV RNA 導入細胞ではどちらの誘導も見られなかった。それに対して、HEK293 細胞, MRC-5 細胞, Vero 細胞では poly IC または HCV RNA いずれを導入した場合にも 15 倍から 1 万倍の高い ISG 誘導能を示したことから、これらの細胞では、何らかの方法で自然免疫系を阻害することにより HCV 複製が増強する可能性がある。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(8) 第二世代 NS5A 阻害剤の抗 HCV 活性の評価

第一世代の NS5A 阻害剤 (Daclatasvir 等) は、内服投与により HCV 複製を強力に抑制するが、JFH-1 株以外の遺伝子型 2 の HCV 株に対しては効果が低い。最近開発された第二世代の NS5A 阻害剤の抗ウイルス効果を異なる遺伝子型の全長 HCV 株を用いて検討した。Daclatasvir は H77S 株 (1a) を低濃度で阻害したが、J6cc 株 (2a), J8cc 株 (2b) に対する阻害効果は弱かった。それに対して、第二世代の NS5A 阻害剤は、遺伝子型に関わらず、いずれの全長 HCV 株の複製も低濃度で阻害した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(9) HCV コア領域のアミノ酸変異がウイルス増殖能に与える影響の評価

構造領域が HCV Genotype 1b 由来、非構造領域が 2a 由来のキメラウイルスを 2 種類作成した (TH/JFH-1, Con1/JFH-1)。更にこれらのキメラウイルスに aa 70 (R/Q) と aa 91 (L/M) の変異を導入した (TH/JFH1-RL, -RM, -QL, -QM, Con1/JFH1-RL, -RM, -QL, -QM)。合成したこれらの HCV 株の全長 RNA をそれぞれ Huh7.5.1 細胞に導入した後、培養細胞中および培養上清中の HCV core 抗原量を測定した。培養細胞中のウイルス量には変化を認めなかったが、培養上清中の core 抗原量は core 領域 70 番アミノ酸変異株である QL 株, QM 株において有意に低下していた。そこで Huh7-25 細胞を用い、これらの変異が HCV ライフサイクルの各ステップに与える影響を評価した。Huh7-25 細胞にこれらの HCV 株の全長 RNA を導入後、細胞内 core 抗原量は変異による差を認めなかったが、感染性ウイルス粒子形成能を示す細胞内感染力価は core 領域 70 番アミノ酸変異株である QL 株, QM 株で著明に低下していた。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(10) HCV コア領域のアミノ酸変異が IFN 感受性に与える影響の評価

コア領域 aa 70 (R/Q) と aa 91 (L/M) の変異を持つ Genotype 1b/2a のキメラウイルスを用い、IFN 感受性について検討を行った。合成したこれらの HCV 株の全長 RNA をそれぞれ Huh7.5.1 細胞に導入した後、IFN- α を添加し培養細胞、上清中の HCV core 抗原量の変化を測定した。その結果、いずれの変異株でも培養上清中、細胞内の HCV core 抗原量が低下し、変異による IFN 感受性に差は見られなかった。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(11) HCV コア領域のアミノ酸変異が細胞表面 MHC class I 発現に与える影響の解析

Core 領域アミノ酸変異株キメラウイルス全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入した後、IFN- γ により宿主細胞表面に発現誘導される MHC Class I を Flow Cytometry

を用いて測定した. TH/JFH-1, Con1/JFH-1 のいずれの変異株においても QL 株, QM 株で細胞表面の MHC class I の発現量が低く抑えられ, Core 領域 70 番アミノ酸に変異を有するウイルスは, 宿主細胞内に蓄積し抗原提示能を抑制することで宿主リンパ球による細胞障害を逃れ, IFN 治療に対して抵抗性を獲得するものと考えられた.

[藤田めぐみ, 杉山奈央, Eui-Cheol Shin (韓国 KAIST), Wonseok Kang (韓国 KAIST), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(12) JFH-1 株のコア領域アミノ酸変異がウイルス蛋白蓄積に与える影響の検討

Core 領域アミノ酸変異株キメラウイルスにおいて, これら変異株を導入した細胞の HCV 陽性細胞数とその陽性細胞内の HCV 蛋白の蓄積について評価を行った. まず, HCV 陽性細胞の比率を Flow Cytometry により検討した. その結果 Core 領域の変異による差は認められなかった. そこで細胞内の HCV 蛋白質量を Flow Cytometry を用いて測定したところ, QL 株, QM 株で細胞内の HCV 蛋白質量が増加していた.

[藤田めぐみ, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(13) HCV NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析

HCV の NS5A に存在する IFN 感受性領域 (ISDR) のアミノ酸変異は, IFN 治療における治療効果の予測因子として知られている. そこで, JFH-1 株を用いた培養細胞系を用い, ISDR のアミノ酸変異が HCV の増殖に与える影響を検討した. HCV JFH-1 株の NS5A を Genotype 1b 株に置換したキメラウイルス (JFH1/5ACon1) を用い, さらに, NS5A の ISDR を wt に置換した i-wt 株および, ISDR に 7 つのアミノ酸変異を持つ i-7mut 株を作製した. これらのコンストラクトを用い, ISDR の変異が HCV ライフサイクルの各ステップに与える影響を評価した. これらの株の HCV 全長 RNA の導入により細胞内の core 抗原量には差は認めなかったが, 上清中の core 抗原量は i-7mut でのみ低値であり, この株では感染性粒子生成効率が低下していると考えられた.

[杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(14) Establishing Hepatitis C genotype-4a (HCV-4a) in-vitro model.

We are aiming to establish a model supporting HCV-4a life cycle. The entire HCV-4a genome is sequenced and cloned (EJ1 clone). The major replicating clone is identified, and a replicon plasmid expressing the non-structural region is constructed. HCV replication analysis is performed. However, no efficient replication was established from the EJ1 clone. Through our collaboration study with Egypt, we obtained a high HCV titer serum from recurrent hepatitis patients after liver transplant, or from chronic HCV patients. The serum will be shipped to Japan soon to be used for the establishment of HCV4a infectious system.

[Hussein H Aly, Hossam Geweid, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(15) phospholipase D (PLD) による感染性 HCV 産生制御機構の解析

halopemide は phospholipase D (PLD) 阻害を介して感染性 HCV 産生を低下させることが示唆された. PLD は HCV 生活環のうち粒子放出過程を制御していること, halopemide 処理細胞では HCV core タンパク質がゴルジに蓄積することが観察された. これにより, PLD は HCV 粒子のゴルジからの輸送過程を制御することが示唆された.

[渡士幸一, 内田奈々子, 脇田隆字]

(16) cyclophilin 阻害剤のインターフェロン経路への影響に関する解析

HCV 感染細胞において cyclophilin 阻害剤処理により PKR の活性化が抑制されることが示唆された. またこれによりインターフェロン (IFN) 情報伝達経路下流

遺伝子の IFN stimulated genes のタンパク質発現が誘導されることが観察された。また cyclophilin は PKR と相互作用しており、これにより PKR の活性化およびそれに引き続いておこる stress granules 形成を制御していると考えられた。

[大東卓史, 渡士幸一, Ann Sluder (SCYNEXIS), Katyna Borroto-Esoda (SCYNEXIS), 脇田隆字]

(17) 感染性 HCV 粒子産生系を用いた天然化合物生理活性の同定

感染性 HCV 産生培養系を用いて、真菌抽出物より単離された Sulochrin が HCV 感染を阻害することが見出された。これは HCV 生活環のうち特に HCV の宿主細胞への侵入を阻害しており、既存薬であるインターフェロンやプロテアーゼ阻害剤と併用することにより相乗的な抗 HCV 効果を示した。また複数の遺伝子型 HCV の侵入に対して阻害効果を示した。

[中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 脇田隆字]

(18) flutamide による感染性 HCV 産生低下機構の解析

感染性 HCV 産生系を用いた化合物スクリーニングにより flutamide が感染性 HCV 粒子の産生を低下させることが明らかとなった。またこれは HCV 生活環中の HCV 粒子形成過程を阻害することによると示唆された。

[大橋啓史, 渡士幸一, 脇田隆字]

(19) C 型肝炎ウイルス抗原を含んだ日本脳炎ウイルス様粒子の作製と中和抗体の誘導

日本脳炎ウイルス (JEV) エンベロープ蛋白質の粒子表面上に露出すると予想される部位に HCV E2 由来中和エピトープを挿入し、培養上清への JEV 様粒子 (SVP) の分泌が阻害されない挿入可能部位を 3ヶ所同定した。挿入した中和エピトープは粒子表面上に提示されていることを蛍光相関分光法を用いて確認した。これらの HCV 中和エピトープを有する JEV SVP (E2-SVP) を恒常的に発現する 293T 細胞を樹立し、培養上清中からゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。この

E2-SVP を免疫したマウスの血清は JEV の感染を中和するとともに、遺伝子型 1b および 2a 由来 HCV に対する感染中和能を示した。

[嵯峨涼平, 藤本陽, 渡邊則幸, 松田麻未, 長谷川慎 (長浜バイオ大), 渡士幸一, 相崎英樹, 加藤孝宣, 中村紀子 (東レ医薬研), 小西英二 (阪大微研), 田島茂 (ウイルス第一部), 高崎智彦 (ウイルス第一部), 竹山春子 (早大院), 鈴木亮介, 脇田隆字]

(20) 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いた 1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

CMV プロモーター下流に日本脳炎ウイルス (JEV) レプリコン cDNA を挿入したプラスミドを構築し、これを JEV 構造領域発現プラスミドと共に哺乳動物細胞に導入すると、1 回感染性 JEV 粒子が産生された。1 回感染性 JEV 粒子は JEV と同様に抗 JEV 血清によりその感染が中和され、またデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を用いても 1 回感染性粒子が産生された。本システムは安全な感染中和アッセイに有用であると考えられる。

[鈴木亮介, 石川知弘 (独協医大), 小西英二 (阪大微研), 松田麻未, 高崎智彦 (ウイルス第一部), 脇田隆字]

(21) 細胞内発現抗体 (イントラボディ) による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制

抗 HCV コア蛋白質抗体を産生する 5 種類のマウスハイブリドーマから、H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子をクローニングし、それぞれの単鎖可変部のみ、および scFv を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドと HCV 全長プラスミドを Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、培養上清中の感染力価を測定する事により、HCV 増殖抑制効果のあるイントラボディを見いだした。これらのイントラボディは、ウイルスの感染初期およびゲノム複製過程には影響せず、細胞内の HCV の感染力価を減少させており、粒子形成過程を阻害している可能性が示唆された。

[松田麻未, 斎藤憲司, 鈴木亮介, 佐藤充, 鐘ヶ江裕美,

千葉丈，齋藤泉，脇田隆字，鈴木哲朗]

(22) HCV 感染に伴う細胞の代謝変化の解析

HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析（メタボロミクス）を行った。HCV 感染により、TCA 回路、プリン・ピリミジン合成系など蛋白核酸合成等は低下し、ATP、GTP、phosphocreatine 等のエネルギー供与体は減少し、一方解糖系は著名に亢進していた。HCV 感染がどのようなメカニズムで宿主代謝に影響を与えているか解析を進めている。

[藤本陽、松田麻未、相崎英樹、鈴木哲朗（浜松医科大学）、脇田隆字]

(23) HCV 感染が宿主細胞のリポ蛋白の代謝に与える影響

HCV 感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リポ蛋白 (VLDL) 分泌低下が報告されている。一方、VLDL は HCV の感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白を解析した。HCV 感染後、培養上清中の VLDL が増加し、低比重リポ蛋白 (LDL) が低下することを見出し、その原因として HCV 感染細胞での VLDL 分解酵素である Hepatic lipase (HL) の発現低下を見出した。HL を過剰発現させた Huh-7 細胞に HCV を感染させた後、培養上清中 HCV の感染価を測定したところ、著しい感染価の低下が見られた。また、HCV 感染直後には一時的に HL 発現発現が見られるものの、感染後時間経過的に HL 発現が低下した。このことから、抗ウイルス応答としての HL 発現上昇が HCV により抑制され、感染性の維持に都合の良い環境を作り出している可能性が示唆された。

[藤本陽、相崎英樹、脇田隆字]

(24) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

C 型慢性肝炎に対する治療は IFN/DAA の治療で 9 割以上の患者に SVR が期待できる。しかしながら、発癌リスクの高い線維化進展例や高齢者の多くが SVR とな

る一方、IFN と異なり DAA の肝発癌抑制作用については不明である。したがって、今後 SVR 後の肝障害や発癌が増加することが懸念される。そこで、今後増加する SVR 後症例の肝障害・肝発癌のリスク評価と抑制法の開発のため、SVR 後の肝病態の解明と新たな検査系・対処法の確立を目指す。

[青柳春代、相崎英樹、小池和彦（東京大学）、平松直樹（大阪大学）、黒崎雅之（武蔵野赤十字病院）、林和彦（名古屋大学）、飯島尋子（兵庫医科大学）、坪田昭人（東京慈恵会医科大学）、鈴木哲朗（浜松医科大学）、考藤達哉（国立国際医療研究センター）、丸澤宏之（京都大学）、福原崇介（大阪大学）、和氣健二郎（ミノファーマゲン製薬）、市野瀬志津子（東京医科歯科大学）、脇田隆字]

(25) HCV 感染に伴う細胞微細構造変化の解析

HCV 感染に伴う肝組織の微細構造変化については多くの報告があるものの、適切なネガコンもなく、患者により病態も大きく異なるため、統一的な判断基準はない。そこで、我々は HCV 感染細胞系を用いて、感染細胞で観察される特徴的な所見に注目し、HCV 慢性肝炎患者の肝臓生体検査サンプルを電子顕微鏡で観察し、オルガネラの変化を調べている。さらに、SVR 後の病態解明のため、SVR 症例の解析も行っている。

[青柳春代、松田麻未、市野瀬志津子（東京医科歯科大）、和氣健二郎（ミノファーマゲン製薬）、相崎英樹、脇田隆字]

(26) HCV 生活環に関与する HCV-NS4B 結合膜蛋白の同定と解析

NS4B 発現細胞から pull-down 法により NS4B に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、複製過程に関与するタンパクとして PREB 等を見出した。PREB は複製複合体を含む HCV 特有の膜構造物形成に重要な役割を果たしてものと考えられた。

[Lingbao Kong（江西農業大学）、山越智（生物活性物質部）、鈴木哲朗（浜松医科大学）、相崎英樹、脇田隆字]

(27) HCV 生活環に関与する HCV-NS5A 結合膜蛋白の同定と解析

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、翻訳、複製過程に関与するタンパクとして ELAVL1 を見出した。HCV RNA と結合する ELAVL1 は NS タンパク質と結合の有無により、HCV 翻訳・複製を制御しているものと考えられる。

[後藤耕司 (東大感染症内科), 山越智 (生物活性物質部), 小池和彦 (東大消化器内科), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆字]

(28) HCV 感染に伴う核膜孔変化の解析

電顕観察により、HCV 感染に伴い核膜孔の増加が観察された。そのメカニズムとウイルス産生に与える影響を調べるため、NS4B, NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS4B, NS5A に結合する核膜蛋白を精製し、プロテオーム解析を行っている。共通する蛋白に着目し、解析を進める。

[青柳春代, 相崎英樹, 山越智 (生物活性物質部), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

(29) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析、siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD を見出した。HSD は NS5A と結合し、HCV 粒子形成の場である脂肪滴へ導くことが示された。さらに、HSD は脂肪滴の産生にも影響を与えることが判明した。

[相崎英樹, 深澤征義 (細胞化学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 本島清人 (明治薬科大学), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

(30) 肝星細胞の HCV 感染性の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞に感染増殖するかを明らか

にすることは重要な課題である。HCV 慢性肝炎患者肝組織の星細胞における HCV タンパクの発現を確認した。さらに、HCV が感染すると cherry の蛍光の局在が変化する星細胞系を樹立した。HCV が星細胞へ感染する可能性を解析する。

[青柳春代, 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

(31) PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムの解析

慢性 C 型肝炎患者に用いられているグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活環のうち、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。その阻害効果は PLA2 の抑制と autophagy 亢進によるものの可能性が示唆された。GL の Autophagy 誘導のメカニズム、PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムについて調べている。

[青柳春代, 松本喜弘 (慈恵医大消化器内科), 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大病院中央検査部), 和氣健二郎 (ミノファージェン製薬), 脇田隆字]

(32) 肝炎検査陽性者の追跡システムの構築

感染を知らないまま社会に潜在しているキャリアが 2011 年時点で 78 万人いると考えられ、さらに感染を知らずに治療を続けていない人も 57-120 万人も存在すると推定されている。効果の高い治療薬や医療費助成があるにもかかわらず、自覚症状がなく治療の必要性を感じないため、検査が治療に結びついていない。そこで、自治体・医療現場・職場での肝炎ウイルス検査により見いだされた陽性者を専門医療機関へ導き、フォローアップすることを目的にしている。

[相崎英樹, 飯島尋子 (兵庫医大), 石上 雅敏 (名古屋大学), 片野義明 (名古屋大学), 菊池嘉 (国立国際医療研究センター), 工藤正俊 (近畿大学), 坂本穰 (山梨大学), 島上哲朗 (金沢大学), 正木尚彦 (国立国際医療研究センター), 吉岡健太郎 (藤田保健), 米田政

志（愛知医大），渡邊綱正（名古屋市立大学），脇田隆字]

(33) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。感染研ウイルス第二部のホームページから、一般のヒト、家庭医、専門家向けに、それぞれ適切な内容の情報を発信している。本年度は新たに HBV について、国の対策を含めてまとめた。感染症週報「HBV, HCV」を更新し、最新の治療について報告した。

[相崎英樹，田中純子（広島大），脇田隆字]

(34) HIV 陽性者における急性 C 型肝炎の集団発生について

2012 年 11 月から 12 月にかけて、近医に通院する HIV 陽性者において、5 人の急性 HCV 感染例が見出された。4 人の HCV 遺伝子の解析を行ったところ、2 人の HCV はホモロジーが高く、共通した遺伝子欠損が見出されたことから、感染源を共有している可能性及び、濃厚かつ繰り返す感染機会を有していた可能性が考えられた。HIV 陽性者に対し、性交渉による HCV 感染予防について啓発する必要があると考えられた。

[青柳東代、井戸田一朗（しらかば診療所）、相崎英樹、脇田隆字]

(35) 霊長類モデルを用いた培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの有効性の検討

我々はこれまでに齧歯類モデルを用いて、培養細胞由来 C 型肝炎ウイルス粒子（HCVcc）が高い免疫原性を持つことを検討してきた。本研究では霊長類モデルとしてマーモセットを選択し、HCVcc の免疫原性及び安全性の更なる解析を行うことを目的とした。HCVcc を免疫し

たマーモセットの血漿から、免疫した HCVcc と同じ遺伝子型 2a のエンベロープタンパク質を認識する抗体が検出され、また、遺伝子型 1 のコアタンパク質を認識する抗体も検出された。また、免疫した全てのマーモセットにおいて、生化学的血液検査および病理学的組織解析の結果、HCVcc 免疫に起因する異常は認められなかった。

[横川寛，中村紀子（東レ医薬研），東濃篤徳（京大霊長類研），鈴木沙織（京大霊長類研），明里宏文（京大霊長類研），石井孝司，加藤孝宣，脇田隆字]

(36) ファージディスプレイ法により見出したヒト抗 E2 抗体の HCV に対する感染中和活性の検討

HCV 感染患者より得た抗体遺伝子ライブラリーを用いて、ファージディスプレイ法にて HCV E2 エンベロープタンパク質に親和性を示す抗体をスクリーニングした。スクリーニングにて見出した 3 種の IgG 抗体に関して、HCVcc に対する感染阻害活性を検討した。その結果、これら 3 種の IgG 抗体は遺伝子型 1a, 1b, 2a, 3a の JFH-1 キメラ HCVcc に対して、既知ヒト抗 E2 抗体であり臨床開発も進んでいる MBL-HCV1 より強い感染阻害活性を示した。また、これら 3 種のヒト抗 E2 抗体のうち 1 種は、エスケープミュータントが発生しづらい抗体である事が示唆された。

[横川寛，中村紀子（東レ医薬研），篠原みどり（抗体研究所），石井孝司，加藤孝宣，脇田隆字]

(37) 高純度 HCV 粒子精製方法の構築

近年、C 型肝炎ウイルスは感染性粒子の細胞培養系が確立され、その不活化粒子は中和抗体を産生しうる抗原としてワクチン開発への利用が期待されている。本研究では、簡便にスケールアップが可能であるクロマトグラフィー法を用いた HCV 粒子の精製方法を選択し、その精製効率を検討した。Benzonase nuclease を用いて精製前サンプルを処理し、夾雑核酸を分解することによってイオン交換クロマトグラフィーにおける HCV 粒子の回収量が増加し、精製効率が改善した。この精

製産物をゲルろ過クロマトグラフィーにてさらに精製を行い、最終精製産物の回収率を求めたところ、超遠心精製とほぼ同等かそれ以上の精製効率である事が示唆された。

[横川寛, 中村紀子 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(38)複製効率の良い遺伝子型 2b サブジェノミックレプリコンの構築

遺伝子型 1 と遺伝子型 2b で増殖効率を上昇すると報告されている NS3, NS4A, NS5B の適応変異 F438L, A15S, D559G (LSG) を遺伝子型 2b のネオマイシン耐性遺伝子を持つサブジェノミックレプリコンに導入し、複製できるかをコロニー形成アッセイで検討したところ、レプリコンが複製するコロニーを形成した。得られたレプリコンをクローン化し、HCV の NS3, NS5A, NS5B 蛋白の局在を免疫蛍光染色法で確認した。複製しているレプリコンゲノムの塩基配列を解析したところ、NS4B 領域に L191M, I131V, R192H, S244G, G72R, G72V と NS5B 領域に Q414L, E330K の変異が同定された。LSG 変異を加えることで今まで培養細胞で複製が出来なかった遺伝子型 2b の HCV 株が複製可能となった。

[Su Su Hmwe, Goki Suda (Hokkaido University), Naoya Sakamoto (Hokkaido University), Michio Imamura (Hiroshima University), Nobuhiko Hiraga (Hiroshima University), Kazuhiko Chayama (Hiroshima University), Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

(38)感染性粒子産生系遺伝子型 2b の構築の検討

サブジェノミックレプリコン細胞から得られた適応変異を LSG 変異とともに、遺伝子型 2b の全長 HCVcDNA に導入し、8 種類の全長コンストラクトを作製した。これらのコンストラクトから作製した RNA を培養細胞に導入すると、感染性ウイルス粒子が産生された。LSG だけのクローンより LSG+1 つの適応変異を加えたクローンの方がウイルス産生が高かった。

[Su Su Hmwe, Goki Suda (Hokkaido University), Naoya Sakamoto (Hokkaido University), Michio Imamura (Hiroshima University), Nobuhiko Hiraga (Hiroshima University), Kazuhiko Chayama (Hiroshima University), Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

(39)E2抗体誘導におけるN型糖鎖の役割

E2 タンパク質の免疫による抗体誘導効果に 11 種類の N 型糖鎖が及ぼす影響について解析した。11 種類の単一 NQ 変異 (糖鎖修飾部位の Asn を Gln に置換) 組換え E2 タンパク質を 293T 細胞から精製した。その後、精製タンパク質をマウスに免疫した。すべての NQ 変異型で E2 抗体誘導を確認した。マウス血清を用いて HCV 感染阻害実験を行ったところ、NQ3, NQ8, NQ10 を免疫したマウス血清において感染阻害効果が低下していた。今後は血清から IgG を精製して詳細に解析を行う。

[渡邊則幸、河野環、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

(40)HCV感染に重要な領域の探索

E1およびE2領域の20アミノ酸のペプチド (51種類) を用意して、これらのペプチドによるHCV感染阻害効果を解析した。ペプチドは前後の配列と10アミノ酸を重複するものでエンベロープ領域を全てカバーする。感染阻害実験の結果、E1 (282-301) とE1 (292-311) の二種類のペプチドにおいてHCV感染阻害が観察された。この領域はウイルスの細胞融合に重要な領域とE1抗体の中和エピトープの間に位置し、感染阻害の新たなターゲット領域として期待ができる。

[渡邊則幸、河野環、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

(41)siRNAをもちいたウイルス感染に重要な新規宿主因子の探索

HCV のライフサイクルに重要な新規宿主因子を探索する目的で、Human inon channel siRNA library (Ambion) を用いて HCV 感染を解析した。338 遺伝子のうち 46 遺伝子の siRNA において、コントロールと比

較して HCV 感染が 50%以下に減少した。その中の 28 遺伝子がカリウムチャネルであった。

[渡邊則幸、河野環、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

(1) HEV 感染性規定宿主因子の探索

HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリの委託作製

非感受性細胞での functional cloning を目指して、感受性サブクローンからの cDNA ライブラリ作製をタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに依頼した。方法は、できるだけ多様性を保つために PCR を出来るだけ小さなプライマー伸長法での作製を希望したが、実現せず、LD-PCR 法での納品となった。しかし、複雑度は 600 万 (受取後、当方でも確認済み) と高く、平均インサート長も自家製のものより良好 (多様性未確認) であり次年度以降の感染性規定宿主因子の同定に大きく貢献するものと期待される。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 加藤孝宣, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(2) 昨年度作製した HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリから得られた感染性規定宿主候補因子の解析

候補因子は、その存在が現在までの HEV 研究報告に矛盾しないことを確認している。また、既に実施した網羅的遺伝子発現比較解析において、他のウイルスでの宿主因子同定時と同等の発現比 (感受性に比べて低下) が見られた。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(3) 感染性規定宿主候補因子の全長クローニング

候補因子の哺乳細胞発現ベクターへの全長クローニングに成功し、非感受性細胞への発現と薬剤選択によって安定発現株を樹立した。今後、結合・感染性相補

試験を予定している。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(4) 感染性規定宿主候補因子に対する市販抗体の評価

HEV の感受性細胞への結合阻害能について市販のモノクローナル抗体・ポリクローナル抗体を 10 種類以上試験したが、現在までに良好な結果を得ることは出来ていない。今後、感染阻害能の検討を予定している。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(5) HEV レプリコンの構築およびレプリコン包埋 VLP 作成の検討

HEV の感染性クローン (genotype 1 および 3) の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。構造蛋白 (ORF2) を発現する細胞にレプリコンを導入した細胞を作成し、これらのクローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、レプリコン RNA は RNase A 抵抗性であり、レプリコンが構造蛋白に包埋された擬似粒子である可能性が示唆された。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(6) HEV レプリコンを用いたウイルス増殖阻害物質のスクリーニング

HEV レプリコン RNA を導入した細胞に薬剤ライブラリーを添加し、レプリコンのレポーター遺伝子の発現を指標として阻害剤のスクリーニングを開始した。現在までに約 1000 種類の薬剤をスクリーニングし、ウイルス増殖阻害活性を持つ化合物を複数見出している。今後、作用機序の解析とウイルス阻害剤としての応用、ウイルス増殖メカニズム解析への応用を検討する予定。

[吉崎佐矢香, 脇田隆字, 石井孝司]

(7) Rat HEV 全長 RNA の感染性の同定

最近、Rat HEV をはじめ、新しい E 型肝炎ウイルスが続々と発見されている。しかしながら、これらのウイルスの増殖できる培養細胞系が樹立されていないため、ウイルスの感染性や病原性などの評価が困難である。本実験では、二株（ドイツ株、中国株） rat HEV の全長を解析した上、in vitro で合成した全長 rat HEV RNA をヌードラット（Long Evans-rnu/rnu）肝臓に直接に接種した後、定期的に採血と採便を行い、ウイルス遺伝子を測定し、ウイルス増殖の有無により全長 Rat HEV RNA の感染性を評価した。その結果、ウイルス接種 4 週後、ラット便中から rat HEV が検出され、さらにその便乳剤をヌードラットに静脈接種したあと、ウイルスの増殖が確認された。Rat HEV 全長 RNA が感染性を有することが明らかになった。

[李天成、楊婷婷、吉崎佐矢香、*網康至、*須崎百合子、石井孝司、脇田隆宇（*動物管理室）]

(8) Rat HEV の細胞培養系の樹立

Rat HEV を PLC/PRF/5 細胞に接種した後、経時的に培養上清中の HEV RNA、HEV 抗原を RT-PCR、ELISA 法で測定し多結果、RNA およびウイルス構造蛋白は検出され、構造蛋白は細胞質に分布していた。培養上清から直径 35nm のウイルス粒子が観察された。さらに培養上清をラットに静脈接種し、rat HEV がラット体内での増幅を確認した。PLC/PRF/5 は rat HEV に感受性を有し、この細胞で増幅したウイルスは感染性を持つことが明らかになった。HEV 培養系が樹立により rat HEV 複製のメカニズムの解明が期待される。

[李天成、楊婷婷、吉崎佐矢香、*網康至、*須崎百合子、脇田隆宇（*動物管理室）]

(9) Moose HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

Moose HEV はヘラジカから分離された新しい HEV である。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて moose HEV の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。

Moose HEV ORF2 の全長 cDNA を合成し、PUC57 にクローニングした。また、N 末端あるいは C 末端を欠損した ORF2 を Moose HEV ORF2 を鋳型として PCR 法で増幅し、定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを用い Tn5 細胞で構造蛋白を発現させた。Moose HEV 構造蛋白の発現が確認されたが、ウイルス様粒子（HEV-LPs）の形成が認められなかった。

[李天成、脇田隆宇]

(10) 日本における ferret HEV 疫学調査

ペットとして飼われているフェレットの糞便、83 検体、血清サンプル 10 検体を用いて日本における ferret HEV 疫学調査を行った。ELISA 法を用いて血清中の抗 ferret HEV IgG および IgM を検査した。RT-PCR 法によるすべてのサンプルを ferret HEV 遺伝子検査を実施した。その結果、血清中の抗 ferret HEV IgG 抗体の保有率は 20% (2/10) であり、糞便中から ferret HEV RNA の検出率は 7.1% (6/83) であった。遺伝子解析の結果、六つの ferret HEV 株が 2 つのクラスターに分布され、ferret HEV 遺伝子の多様性を示していた。この結果、日本でペットとして飼われているフェレットにも ferret HEV に感染されていることが明らかになった。

[李 天成、*前田健、脇田隆宇（*山口大学）]

(11) Ferret HEV に対するラットとサルの感受性

Ferret HEV は遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するウイルスであり、その病原性やヒトへの感染性などの情報が少なく、ヒト由来 HEV がラットに感染するかどうかについてもいまだ明らかにされていない。本実験では ferret HEV に対するラットおよびサルの感受性を感染実験で確認し、ferret HEV の宿主および人獣共通感染症を引き起こす可能性を検討した。Ferret HEV を Wistar rat, nude rat, カニクイザルに接種し、経時的に採血と採便を行った。血液中のウイルス抗原、特異抗体、ウイルス遺伝子、ALT/AST および、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した。その結果は ferret

HEV はラットとカニクイザルに感染しなかった。

[李天成、吉崎佐矢香、*網康至、*須崎百合子、脇田隆字 (*動物管理室)]

(12) ラット HEV 粒子形成に必須な領域の同定

ラット HEV ORF2 の N 末端から 100 アミノ酸を欠失させた構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 24nm と 35nm の 2 種類の中空粒子が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は N 末端の 100 個のアミノ酸以外に C 末端から一部のアミノ酸が欠失していた。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した種々のクローンを発現し、VLP 形成に必須な領域の同定を試みていた。N 末端から 100 個のアミノ酸を欠失させた上に、C 末端から 593 番目まで 52 個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなくなった。したがって、粒子形成には C 末端は 593 番目のアミノ酸までが必須であった。N 末端は 123 番目まで必須である。現在、ネイティブサイズの粒子の形成に必要な領域を同定している。

[李天成、楊婷婷、片岡紀代 (感染病理部)、脇田隆字]

(13) フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性の検討

Ferret HEV は最近発見された新しい E 型肝炎ウイルスである。ウイルス配列以外、このウイルスに関する情報がほとんど知られていない。本研究ではアメリカから輸入されたフェレットから経時的に採血と採便を行ない、血液中のウイルス抗原、抗体、ウイルス遺伝子、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定した。また、血中の ALT/AST、 γ GTP を測定することにより、ウイルスの感染の特徴および病原性等を検討した。アメリカから輸入したフェレットでは、ferret HEV 感染後に ALT、AST が上昇し、ウイルス感染と肝機能障害の関連が示唆された。フェレットにおける ferret HEV の感染は不顕性感染、急性肝炎、持続感染という 3 つのパターンをとることが示された。

[李天成、楊婷婷、*片岡紀代、**網康至、**須崎百

合子、***岸田典子、***白倉雅之、***今井正樹、***浅沼秀樹、****武田直和、脇田隆字 (*感染病理部、**動物管理室、***インフルエンザセンター、****大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

(14) 中国由来 rat HEV 全長ゲノムのクローニング及び配列の解析

Rat HEV RNA 陽性であるラットおよびスnekスの糞便を出発材料として、ウイルス遺伝子を解析した。Rat HEV RNA 陽性便を 10%便乳剤に作成し、RNA を抽出した。RT-PCR 方を用いて rat HEV 全長配列の増幅を試みた。現在 rat HEV577 株およびスnekス由来 1129 株の全長遺伝子の増幅に成功した。塩基及びアミノ酸の解析により、中国のラットおよびスnekス由来の rat HEV はドイツから分離された rat HEV との遺伝子型と異なり、rat HEV 遺伝子型の多様性が示唆された。

[李 天成、*黎薇、*管大偉、*柯昌文、**網 康至、**須崎百合子、***武田直和、脇田隆字 (*中国広東 CDC、**動物管理室、***大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Abe Y, Aly HH, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 synthase inhibitor and prostaglandin I2 receptor agonist are potent anti-Hepatitis C virus (HCV) drugs. *Gastroenterology* 145(3): 658-667, 2013.
- 2) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* 145(2): 447-55. e1-4, 2013.
- 3) Arita M. Development of poliovirus extraction method from the stool extracts by using magnetic nanoparticles sensitized with soluble poliovirus receptor. *J Clin Microbiol* 51(8): 2717-2720, 2013
- 4) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87(8): 4252-4260, 2013
- 5) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* 87(9):4907-4922, 2013
- 6) Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J; CEVHAP North Asia Workshop on Viral Hepatitis. Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO Framework for Global Action on viral hepatitis in North Asia. *J Hepatol.* 2013 59(5):1073-80.
- 7) Guan D, Li W, Su J, Fang L, Takeda N, Wakita T, Li TC, and Ke C. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. *Emerg Infect Dis.* 2013 19(8):1341-1343.
- 8) Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(5):454-7
- 9) Higo-Moriguchi K, Shirato H, Someya Y, Kurosawa Y, Takeda N, Taniguchi K. (2013) Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigens. *J. Med. Virol.* 86(4), 558-567.
- 10) Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, Shimizu H, Nadova K, Sobotova Z, Gavrillin E, Roivainen M. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2 Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One* 8(7):e66849. 2013
- 11) Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol.* 2013 5(2):119-25.

- 12) Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. *Biochem Biophys Res Commun* Jul;437(1): 127-33, 2013.
- 13) Iwai-Itamochi M, Yoshida H, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Kurata T, Takizawa T. Development of real-time PCR to detect oral vaccine-like poliovirus and its application to environmental surveillance. *J Virol Methods* 195, 148-155. 2014
- 14) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun* 443(3):808-13, 2014.
- 15) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, Shirasawa H, Kiyohara T, Ishii K, Wakita T, Okamoto H, Yokosuka O. Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus. *PLoS One* 2014 9 (7): e101993.
- 16) Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T. Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
- 17) Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, Shimosegawa T. 1(OH) vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. *PLoS One* 8(5): e63672, 2013.
- 18) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013 158(10):2059-68.
- 19) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S: A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with Fab from neutralizing antibody. *J Virol* 87: 11363-11370, 2013
- 20) Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Wakita T. No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats. *Emerg Infect Dis*. 2013 19(8):1343-5.
- 21) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol*. 2013 163(1-2):54-61.
- 22) Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, Ke C, Li TC. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet Microbiol*. 2013 165 (3-4): 275-80.
- 23) Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 11;440(1):150-156.

- 24) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro. *PLoS One*. 2013 8(7):e68992.
- 25) Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T: Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci*. 2013, 75:1651-5
- 26) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes Infect*. 2014 16(2):114-22.
- 27) Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One*. 2013;8(6):e66534
- 28) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 440(4):515-20.
- 29) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H: Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. *PLoS Pathog* 9: e1003511, 2013
- 30) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology*. 2014 146(2):562-72.
- 31) Oshiumi H, Aly HH, Funami K, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of type I interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 61(2): 127-38, 2013.
- 32) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep*. 2013 22;3:3243.
- 33) Shimura S, Ishima M, Nakajima S, Fujii T, Himeno N, Ikeda K, Izaguirre-Carbonell J, Murata H, Takeuchi T, Kamisuki S, Suzuki T, Kuramochi K, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F. Total synthesis and anti-hepatitis C virus activity of MA026. *J Am Chem Soc*. 135 (50): 18949-18956, 2013.
- 34) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. *J Virol* 87(10): 6031-6, 2013.
- 35) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog*.

- e1003589 (2013).
- 36) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 95:60-65 (2014)
- 37) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA. *PLoS One* Dec;8(12): e83639, 2013.
- 38) Takebe Y, Saucedo CJ, Lund G, Uenishi R, Hase S, Tsuchiura T, Kneteman N, Ramessar K, Tyrrell DL, Shirakura M, Wakita T, McMahon JB, O'Keefe BR. Antiviral Lectins from Red and Blue-Green Algae Show Potent In Vitro and In Vivo Activity against Hepatitis C Virus. *PLoS One.* 2013 8(5):e64449.
- 39) Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J Lipid Res.* 2013 Apr;54(4):881-92.
- 40) Tao Z, Zhang Y, Liu Y, Xu A, Lin X, Yoshida H, Xiong P, Zhu S, Wang S, Yan D, Song L, Wang H, Cui N, Xu W. Isolation and Characterization of a Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus from Environmental Surveillance in China, 2012. *PLoS ONE* 8(12): e83975. 2013
- 41) Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res* 12: 2537-2551, 2013
- 42) Tsukuda S, Watashi K. NTCP Transporter as Novel Target for Anti-Hepatitis B Virus Agents. *Clin Res Infect Dis.* 1(1): 1004, 2014.
- 43) Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial drugs potentially inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS One.* 2013 8(8):e72519.
- 44) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol Chem.* 288(44): 31715-31727, 2013.
- 45) Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci.* 15(2): 2892-2905, 2014
- 46) Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, Sisouk T, Phonekeo D, Sengkeopaseuth B, Som-Oulay V, Ishii K, Wakita, Sugiyama M, Hachiya M. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*, 9, e88829 (2014)
- 47) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. *World J Gastroenterol*, 20(11): 3044-9, 2014.

- 48) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li TC. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. J Gen Virol. 2013 94 Pt 12:2647-56.
- 49) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit. Jpn J Infect Dis 66, 564-566, 2013
- 50) Zheng H, Lu J, Zhang Y, Yoshida H, Guo X, Liu L, Li H, Zeng H, Fang L, Mo Y, Yi L, Chosa T, Xu W, Ke C. Prevalence of Non-polio Enteroviruses in the Sewage of Guangzhou City, China, from 2009 to 2012. Appl Environ Microbiol 79(24):7679-83, 2013
2. 和文発表
- 1) 相崎英樹、松田麻未、藤本陽、脇田隆宇、HCV 感染実験系における代謝変化、臨床消化器内科、29(7):810-813, 2014
- 2) 相崎英樹、HCV 感染と代謝異常(脂質・エネルギー) 医学のあゆみ、246(8), 666-667, 2013
- 3) 有田峰太郎、抗エンテロウイルス化合物群の探索研究, ファルマシア、49(11): 1095-1100:, 2013
- 4) 有田峰太郎、抗エンテロウイルス化合物群の探索とそのウイルス感染阻害機構の解析, ウイルス、63(1): 93-102, 2013
- 5) 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
- 6) 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン BIO Clinica 28: 25-29 (2013)
- 7) 片山和彦 ノロウイルスについて 健康教室 vol.710 p74-79, 2010
- 8) 片山和彦 ノーウォークウイルスの特徴と予防対策 食品機械装置 vol.50, p52-59, 2013.
- 9) 片山和彦 ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム 感染症 vol. 253, p12-13, p19-21, 2013.
- 10) 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム 食と健康 10月号 p9-17, 2013.
- 11) 片山和彦 増加傾向にあるサポウイルス食中毒 食と健康 11月号 p16-19, 2013.
- 12) 片山和彦 ノロウイルスの感染予防 小学保険ニュース p1, 2014年1月18日号
- 13) 児玉弘美 小菅裕也 山田香織 鈴木智之 小嶋美穂子 石川和彦 井上剛彦 谷口秀美 吉田弘 無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出状況 (2013 年) —滋賀県 IASR Vol. 34 p. 309-310: 2013 年 10 月号
- 14) 清水博之. ライノウイルスの分類と疾患への関与. 日本医事新報 4689: 53-55, 2014
- 15) 清水博之. 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44, 94-96, 2014
- 16) 清水博之. わが国のポリオ流行とポリオワクチンの歴史. 小児内科 45 増刊号「予防接種Q&A 改訂第3版」, 286-290, 2013
- 17) 清水博之. わが国と世界のポリオの現状と問題点. 小児内科 45 増刊号「予防接種Q&A 改訂第3版」, 291-295, 2013
- 18) 清水博之. 生ワクチンの存続. 小児内科 45 増刊号「予防接種Q&A 改訂第3版」, 300-301, 2013
- 19) 清水博之. 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. 日本医事新報 4673, 56-57, 2013
- 20) 清水博之. 不活化ポリオワクチンの現状、ファルマシア 49, 211-216, 2013
- 21) 清水博之. 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 43, 50-51, 54-59, 2013
- 22) 清水博之. 不活化ポリオワクチン導入の現状と今後の課題. Bio Clinica 28, 19-24, 2013
- 23) 清水博之. ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. モダンメディア 54, 85-92, 2013

- 24) 鈴木亮介、小西英二：フラビウイルスのリバー
スジェネティクス、「ウイルス」63 巻 1 号、13-22、
2013
 - 25) 高山直秀、崎山 弘、清水博之、梅本 哲。経口生ポ
リオワクチン1～2回目および不活化ポリオワク
チン1～4回目接種の全国累積接種率：2013年の
調査結果。日本医師会雑誌 143：609-614，2014
 - 26) 藤井克樹、片山和彦：ロタウイルスの概要，病
原体微生物情報 (IASR) Vol. 35(3)，3-4：2014.
 - 27) 藤井克樹：特集記事「ロタウイルス食中毒の事
例と注意ポイント」，食と健康 11 月号，9-15：
2013
 - 28) 村山麻子，加藤孝宣。NS5B-RNA ポリメラーゼの
構造と機能。肝胆膵，67(6)，918-923，2013.
 - 29) 脇田 隆宇、HCV 感染の生活環と Druggable
targets. 肝・胆・膵 (0389-4991)67 巻 6 号
Page789-795(2013.12)
 - 30) 渡土幸一 薬学的視点からのウイルス学研究 - 肝
炎ウイルス複製阻害化合物の同定とその作用機
序 -、薬学雑誌、133(11)：1169-1175，2013.
3. その他
- 1) 片山和彦：食中毒予防必携 第3版 社団法人 日
本食品衛生協会 ノロウイルス p215-225，2013
 - 2) 片山和彦、岡智一郎、臨床検査ガイド 2013-2014
文光堂 ノロウイルス・サポウイルス p 769-771、
2013.
 - 3) 清水博之(分担執筆)：Country Progress Report
on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO
report; Aannual WHO report, 2012
4. (新聞) 指導、監修
- 1) 週間 ホテルレストラン 猛威をふるったノロウ
イルスを検証p57-60，2月8日号，2013.
 - 2) 日経メディカル ニュース追跡 ノロウイルス変
異株が猛威 p33，1月号，2013.
 - 3) 片山和彦 冬の食中毒、ノロウイルスの感染予防
対策 健康ふしぎ発見ニュース からだの不思議
12月号，p12-6，2013. 健学社.
 - 4) 片山和彦 しっかり手洗いで防ぐノロウイルス 健
康の広場 第1775号 平成24年1月11日号 4面 株
式会社 法研
 - 5) 片山和彦 ノロウイルス対策 心と体 保険総合
大百科 保険ニュース・心の健康ニュース 縮刷
活用版 2011年 少年写真新聞社
ISBN978-4-87981-361-9
 - 6) 医薬品の品質管理とウイルス安全性 第7章 新
しいウイルス検出法、ウイルス診断法、ウイルス
試験 総論 (執筆；片山和彦) 日本医薬品等
ウイルス安全性研究会 ISBN978-4-8306-0331-0
 - 7) 朝日新聞 2014年2月22日土曜日 夕刊 1面「ノ
ロ感染まだ要警戒・寒い首都圏 続く発生」
 - 8) 朝日小学生新聞 2013年12月20日金曜日 日刊 1
面「手洗いで予防ノロウイルス」
 - 9) 朝日新聞 2013年11月27日水曜日 日刊 37面「ノ
ロウイルス流行の兆し」
 - 10) 読売新聞 2014年1月22日水曜日 日刊 25面 ノ
ロウイルス食中毒 全国流行 トイレで飛散、感
染に注意
 - 11) 朝日新聞 2013年12月1日日曜日 日刊 16面 ノ
ロウイルス手洗いで撃退
 - 12) 少年写真新聞社 ほけん通信 2014年1月18日号
ノロウイルスの性質を知って、流行の広がりを防
ごう
 - 13) 少年写真新聞 2014年1月18日号 知っています
か？ノロウイルスの通り道
 - 14) 朝日小学生新聞 2014年1月18日土曜日 日刊 1
面「ノロウイルス？905人欠席・静岡・浜松の14
項 下痢やはき気」
 - 15) AERA 2014年2月3日 #5 ノロウイルスを無自覚
でまき散らす脅威「激しい突然変異で拡散」
p58-59
 - 16) 朝日新聞 2014年1月28日火曜日 夕刊 10面 ノ
ロ流行続く

- 17) 共同通信社 2014年2月4日 あなたも感染源に？
ノロウイルス、意識変えて 経路多く、症状ない
人も
- 18) 時事通信社 ノロウイルス流行拡大＝自覚症状無
くても感染源に-手洗い徹底を
- 19) 日本経済新聞 2014年2月25日火曜日 日刊 18
面 ノロウイルス攻略に道
- II. 学会発表
- 国際学会
- 1) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita
T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M.
Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent
production of infectious hepatitis C virus.
20th International Symposium on Hepatitis C
and Related Viruses. Melbourne, Australia.
2013. 10. 6-10.
- 2) Aizaki H, Dynamic metabolomics change in
HCV-infected cell, Italy-Japan Hepatitis
meeting “Hepatitis, steatosis and cancer:
molecular basis and clinical link” , October
20, 21, 2013
- 3) Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Hmwe SS,
Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T,
Wake K, Miyamura M, Suzuki T, Wakita T,
Hepatitis C virus RNA replication in human
stellate cells regulates gene expression of
extracellular matrix-related molecules.
17th International Symposium on the Cells of
the Hepatic Sinusoid. Osaka International
Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep.
23-25)
- 4) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. The
discovery of a new virus/host interaction
regulating HBV life cycle. 2013
International Meeting on Molecular Biology
of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China.
2013. 10. 20-23.
- 5) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N,
Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T,
Wakita T, Dynamics of the cellular metabolome
during hepatitis C virus infection-
Regulation of the lipoprotein metabolisms by
hepatic lipase, -20th International
Symposium on Hepatitis C Virus and Related
Viruses, Melbourne (Australia),
2013. 10. 6-10.
- 6) M Fukasawa, S Nagase, M Yamashita, M Iida,
Y Shirasago, A Watari, T Suzuki, T Wakita,
K Yagi, M Kondoh. Inhibition of hepatitis C
virus infection by mouse anti-claudin 1
monoclonal antibodies. 20th International
Meeting on Hepatitis C and Related Viruses.
Melbourne Convention and Exhibition Centre,
Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
- 7) Fukushima S, Nakano T, Shimizu H, Hamada A.
Immunogenicity and Safety of Booster Doses of
Inactivated Polio Vaccine. The 7th Vaccine and
ISV Congress, Barcelona, Spain, 27-29 October,
2013
- 8) Imamura H, Yamada N, Yotsuyanagi H, Kawasaki
S, Takayama T, Yamamoto M, Kokudo N, Kato T,
Tanaka S, Arai S. Moderately causative role
of occult hepatitis B virus infection
(occult HBV) in the development of non-
hepatitis B virus (HBV) infection, non-
hepatitis C virus (HCV) infection (NBNC)
hepatocellular carcinoma (HCC). 64th Annual
Meeting of the American Association for the
Study of Liver Diseases. Washington DC, USA.
2013. 11. 2-5.
- 9) Ishii K. Epidemiological and genetic
analysis of hepatitis A virus infection in
Japan. 15th International Conference on
Emerging Infectious Diseases (EID) in the
Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013

- 10) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014
- 11) Ito M, Ito N, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013. 10. 6-10.
- 12) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Suzuki R, Aizaki H, Kusuhara H, Wakita T. Mechanistic analysis of hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013. 10. 20-23.
- 13) Kataoka C, Nishimura Y, Suzuki T, Kotani O, Iwata N, Nagata N, Ami Y, Shimizu H: VP1-145 of enterovirus 71 is one of the determinants for pathogenicity in a cynomolgus monkey model. 18th International Picornavirus Meeting, Blankenberge, Belgium, 2014. 3. 9-14
- 14) Katayama K, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka T, Guix S, Sharp TM, Atner RL, Crawford SE, Estes MK. A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA. Fifth International Conference on Calicivirus, Beijing, China. 2013. 10. 12-15.
- 15) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Takuya Matsumura, Masaaki Shiina, Shinichi Asabe, Takaji Wakita, Michio Imawari. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 16) S Kim, T Date, H Yokokawa, T Kono, H Aizaki, C Gondeau, P Maurel, T Wakita. Infectious Genotype 3a Hepatitis C Virus in Cell Culture. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
- 17) Kondo Y, Iwata T, Morosawa T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Kato T, Shimosegawa T. 1(OH)Vit D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C (CH-C) and CH-C with severe fibrosis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 18) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kogure T, Kato T, Nakayama K, Shimosegawa T. Lymphotropic HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune and cryoglobuline-related diseases. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 19) Kotani O, Asif N, Suzuki T, Iwata N, Nakajima N, Katano H, Hosomi T, Tsukagoshi H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. Europic 2014 (Belgium) 2014. 3. 9-14

- 20) Li T.C., Ishii K., Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., Takeda N. and Wakita T. An unrecognized hepatitis E outbreak in a monkey facility The 23st Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 6-10 June 2013, Singapore
- 21) Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- 22) K Murakami, C Kurihara, T Oka, R Todaka, Takaji Wakita, T Matsuda, R Hokari, K Kazuhiko. Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding. Fifth International Calicivirus Conference, Beijing, China (2013, Oct. 12-15)
- 23) Murakami K, Qu L, Katayama K, Estes M. Screening of candidate proteins for norovirus co-receptors. Fifth Annual Frontiers in Digestive Diseases, Houston, USA. 2014. 2. 8. Aly HH, Shimotohno K, Wakita T, Oshiumi H, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 24) Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013. 10. 6-10.
- 25) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 26) Nagamori S, Aizaki H, Matsumoto Y, Isozumi N, Wiriyasermkul P, Matsuura T, Kanai Y, omprehensive and comparative proteomics reveals alterations of metabolomics between monolayer and three-dimensional cell cultures. 12th Human Proteome Organization World Congress, Yokohama (Japan) September 14-18, 2013.
- 27) Nagata N, Kotani O, Iwata N, Suzuki T, Sato Y, Koike S, Iwasaki T, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H. A comparison of human enterovirus detection in experimentally infected neonatal mice using immunohistochemistry. Europic 2014, (Belgium) 2014. 3. 9-14
- 28) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Isolation of a natural product inhibiting the transcriptional activity of liver X receptor and reducing the production of infectious HCV. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne (Australia), 2013. 10. 6-10.
- 29) Nakajima S, Watashi K. Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system. The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products, Yokohama (Japan), 2013
- 30) Nakamura T, Hamasaki M, Yoshitomi H,

- Ishibashi T, Yoshiyama C, Maeda E, Sera N, Yoshida H. Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water during the Introduction Period of Inactivated Polio Vaccine in Japan. 18th International Picornavirus meeting (EUROPIC 2014), Blankenberge, Belgium, 2014. 3. 9-14
- 31) N Ogura, K Watashi, T Wakita. FORMATION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR (ccc) DNA IN HepAD38.7 CELLS, A TETRACYCLINE INDUCIBLE HBV EXPRESSION CELL LINE. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- 32) Park Y, Takai-Todaka R, Murakami K, Katayama K. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. Fifth International Conference on Calicivirus, Beijing, China. 2013. 10. 12-15.
- 33) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Yaguchi S, Matsumoto T, Shirouzu M, Yokoyama S, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Kojima S, HCV NS3 protease plus TNF- α promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- β type I receptor. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 26-27)
- 34) Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4_2006b. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- 35) Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Wakita T and Suzuki T. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into the infectious particles. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
- 36) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries. The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 2013, 11. 25
- 37) Shimizu H. Introduction of Inactivated Poliovirus Vaccines in Japan: Global and Local Status of Polio Immunization. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases. Tokyo, 2013, 9. 12
- 38) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013, 4. 4-5
- 39) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 2013, 4. 4-5.
- 40) Shimoike T, Takagi H, Oka T, Murakami K, Takai-Todaka R, Park Y, Fujii Y, Wakita T, Katayama K: The localization and interaction among the viral proteins and RNAs of Murine Norovirus in Raw264.7 cells 5th International Conference on Caliciviruses Oct. 12-15 2013 Beijing, China.
- 41) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1

- variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013. 10. 6-10.
- 42) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013. 10. 6-10.
- 43) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells by downregulation of claudin-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 44) Suzuki R, Konishi E, Ishikawa T, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses, Boston, U.S.A. 2013. 4. 28-5. 3
- 45) Suzuki R. Endocytosis pathway for entry of hepatitis C virus. Italy-Japan Liver Workshop, Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links. Trapani, Italy. 2013. 10. 20-21.
- 46) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 47) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A retinoid derivative inhibits hepatitis B virus entry mediated by NTCP. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai (China), 2013
- 48) T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 - 15)
- 49) T Wakita. Hepatitis C virus cell culture system and antiviral development. 17th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (2013, Sep. 23-25)
- 50) Watashi K, Daito T, Sluder A, Borroto-Esoda K, Wakita T. Cyclophilin inhibitors potentiate interferon signaling through diminished PKR phosphorylation in HCV-infected cells. European Association for the Study of the Liver 2013, Amsterdam (Netherlands), 2013
- 51) Watashi K, Daito T, Sluder A, Borroto-Esoda K, Wakita T. Novel regulation mechanism of interferon signaling by cyclophilin through modulation of PKR in HCV-infected cells. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne (Australia), 2013
- 52) Watashi K, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Nakajima S, Iwamoto M, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y,

- Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai (China), 2013
- 53) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai (China), 2013
- 54) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Chiaki Okuse, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, USA. 2013. 11. 2-5.
- 55) Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 56) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China
2. 国内学会
- 1) 相崎英樹、グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用-Phospholipase A2 およびオートファジーによる HCV 分泌過程の制御-、シンポジウム「オートファジーにかかる治療戦略 2014」、東京、2014 年 2 月 15 日
- 2) 青柳東代, 相崎英樹, 松本喜弘, 松田麻未, Su Su Hmwe, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 宮村達男, 和氣健二郎, 脇田隆字, Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗 HCV 作用-, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 3) 青柳東代, 相崎英樹, 藤本陽, 松本喜弘, 松田麻未, Su Su Hmwe, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 和氣健二郎, 宮村達男, 脇田隆字, Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗 HCV 作用-, 日本分子生物学会第 36 回年会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日.
- 4) 阿部雄一、長谷川輝、アリ・ハッサン・フセイン、平賀伸彦、今村道雄、脇田隆字、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠、トロンボキサン A₂ 合成酵素は C 型肝炎ウイルスの感染性粒子形成を制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、(2013, 12.3-6)
- 5) Aly HH, 渡士幸一, 茶山一彰, 脇田隆字. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12.
- 6) Aly HH, 渡士幸一, 茶山一彰, 脇田隆字. Functional screening of human kinases interacting with Hepatitis B virus life cycle. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013. 12. 3-6.
- 7) 有田峰太郎: 新規エンテロウイルス遺伝子検出法. 衛生微生物技術協議会第 34 回研究会, 名古屋, 2013. 7. 12.
- 8) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリー I は minor enviroxime 様化合物の標的である. 第 61 回日本ウイルス学会総会, 神戸, 2013. 11. 12
- 9) 飯塚節子、清水博之: RD-A 細胞を用いた Human

- enterovirus A の分離. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013. 11. 11-13
- 10) 石井孝司, 李 天成, 吉崎佐矢香, 塩田智之, 脇田隆字: E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検討, 第 61 回日本ウイルス学会, 平成 25 年 11 月, 神戸
 - 11) 伊藤陽里, 中込とよ子, 中込治, 藤井克樹, 片山和彦: 京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 倉敷, 2013. 6. 8-9.
 - 12) 伊藤昌彦, 伊藤徳臣, 福原崇介, 鈴木亮介, 田川陽一, 松浦善治, 脇田隆字, 鈴木哲朗. 肝細胞癌株のリプログラミングによる HCV 感受性および腫瘍原性の低下. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
 - 13) 岩本将士, 渡士幸一, 九十田千子, アリ フセイ, 鈴木亮介, 相崎英樹, 小祝修, 楠原洋之, 脇田隆字. ヒト NTCP 安定発現細胞株における B 型肝炎ウイルス侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
 - 14) 内田奈々子, 渡士幸一, 中嶋翔, 岩本将士, 鈴木亮介, 相崎英樹, 千葉丈, 脇田隆字. C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
 - 15) 片岡 周子, 西村 順裕, 鈴木 忠樹, 小谷 治, 岩田 奈織子, 永田 典代, 網 康至, 清水 博之: エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12
 - 16) 片山和彦 レファレンスセンター会議 ノロウイルス 衛生微生物技術協議会 平成 25 年 7 月 11 日, 12 日
 - 17) 金ソレイ, 伊達朋子, 横川寛, 河野環, 相崎英樹, 脇田隆字, C 型肝炎ウイルス遺伝子型 3a の培養細胞におけるウイルス感染実験系の確立, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, (2013, 11. 10-12)
 - 18) 清原知子, 石井孝司, 多田有希, 脇田隆字, A 型肝炎のリスクアセスメント, 第 17 回日本ワクチン学会学術集会, 三重県総合文化センター, (2013, 11. 30-12. 1)
 - 19) 清原知子, 石井孝司, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字: 小児における HBs 抗原保有率調査, 第 61 回日本ウイルス学会, 平成 25 年 11 月, 神戸
 - 20) 黒河健太, 室井敦, 高橋宏隆, 竹田浩之, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 澤崎達也, HCV タンパク質と相互作用をする E3 リガーゼの網羅的探, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, (2013, 11. 10-12)
 - 21) 小泉吉輝, 岩見真吾, 内田奈々子, 脇田隆字, 渡士幸一. 数理モデルによる抗ウイルス薬の薬効評価系の確立. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013
 - 22) 古賀れいな, 宮川敬, 松永智子, 渡士幸一, 脇田隆字, 梁明秀, Tetherin/BST-2 は HBV 複製を負に制御する, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, (2013, 11. 10-12)
 - 23) 小谷治, Naeem Asif, 鈴木忠樹, 岩田奈織子, 中島典子, 片野晴隆, 細見卓司, 塚越博之, 長谷川秀樹, 田口文広, 清水博之, 永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus (SAFV) 患者由来株の病原性の比較解析. 岐阜市, 9 月 20~22 日, 2013
 - 24) 小谷治, Naeem Asif, 鈴木忠樹, 岩田奈織子, 中島典子, 片野晴隆, 長谷川秀樹, 田口文広, 清水博之, 永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013. 11. 11-13
 - 25) 後藤耕司, 相崎英樹, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 山越智, 四柳宏, 森屋恭爾, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆字, C 型肝炎ウイルス NS5A 結合膜タンパク質 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
 - 26) 坂田幸太郎, 相崎英樹, 小嶋聡一, C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β 疑似活性を介した肝線維化誘導機構-TNF- α との協調作用による肝細胞の感受性亢進, 第 40 回日本肝臓学会西部会, 2013 年 12 月 6-7 日
 - 27) 佐藤裕徳, 横山勝, 本村和嗣, 中村浩美, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 田中智之. ノロウイルス GII. 4_2006b のカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約. 第 61 回日本ウイルス学会

- 学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.
- 28) 史国利、安東友美、鈴木亮介、伊藤昌彦、脇田隆字、鈴木哲朗. The RNA structures located at 3' end of HCV genome act as cis-elements in selective packaging of its genome into the infectious particles. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
- 29) 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代: コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013. 11. 11-13
- 30) 塩田智之: E型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白 C 末端 52 アミノ酸の機能解析. 第25回肝炎ウイルスセミナー(肝炎研究基盤整備事業), 東京, 2014年2月
- 31) 塩田智之: ウイルス研究の現場から保健を考える(平成25年度東京大学医学部健康総合科学科開講科目「保健と教育」オムニバス形式), 東京, 2014年1月
- 32) 塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, 下島昌幸, 西條政幸, 脇田隆字, 石井孝司: E型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究. 第61回日本ウイルス学会学術集, 兵庫, 2013年11月
- 33) 清水健太、濱口杉大、李 天成、吉松組子、有吉紅也、有川二郎: ラット E 型肝炎ウイルスは人獣共通感染症の病原体か? 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月神戸.
- 34) 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦、マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノムRNAとの相互作用、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11. 10-12)
- 35) 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松 久、久保田智己: 結晶構造解析と QM/MM 計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸
- 36) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12.
- 37) 鈴木亮介、小西英二、石川知弘、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
- 38) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字、プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス産生系の確立、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、(2013, 12. 3-6)
- 39) 染谷雄一、守口匡子、白土東子、武田直和、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜「ヒト型抗ノロウイルス抗体によるノロウイルス粒子-血液型抗原相互作用の阻害」第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11-13日
- 40) 染谷雄一「ノロウイルスプロテアーゼの基質特異性について」日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月27-30日
- 41) 大東卓史、渡士幸一、Ann Sluder、中嶋翔、Katyna Borroto-Esoda、藤田尚志、脇田隆字. PKR 活性化制御を介するシクロフィリン阻害剤の新たな抗 C 型肝炎ウイルス作用機序. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸, 2013年11月10-12日.
- 42) 高木弘隆、藤井克樹、小林宣道、棚林清、片山和彦: 多様な A 群ロタウイルス株に対応する感受性 MA104 細胞クローン樹立の試み 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12.
- 43) 武田緑、池田正徳、森京子、矢野雅彦、有海康雄、団迫浩方、脇田隆字、加藤宜之、骨粗鬆症治療薬であるラロキシフェンの抗HCV活性機構について、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6. 6-7)

- 44) 田中寅彦、山本真民、黒田和道、脇田隆宇、池田正徳、加藤宣之、槇島誠、C型肝炎ウイルスNS4Bの両親媒性ヘリックス内疎水性残基がウイルス複製に果たす役割、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 45) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆宇。B型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定およびそのNTCPを介した感染阻害機構の解明。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 46) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆宇、中西章、片山和彦、カリシウイルスのリバースジェネティックシステムを用いた感染性粒子の研究、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 47) 長井 誠、南-福田 藤子、小原潤子、小池新平、赤松裕久、土赤 忍、片山幸枝、大場真己、佐々悠木子、大松 勉、古谷哲也、片山和彦、白井淳資、水谷哲也、糞便を材料とした次世代シーケンスによるウシA群ロタウイルスの遺伝子型別、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月、岐阜
- 48) 中嶋翔、渡士幸一。ウイルス感染系を基盤とした真菌由来天然化合物の生理活性探索。天然物ケミカルバイオロジー第4回公開シンポジウム、つくば、2013
- 49) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆宇。Liver X receptor 転写活性および感染性C型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日。
- 50) 中村 朋史、吉富 秀亮、石橋 哲也、前田 詠里子、世良 暢之、吉田 弘：IPV移行時におけるポリオウイルスサーベイランス。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013.11.10-12.
- 51) 西村直子、野口篤子、伊藤陽里、辰巳正純、大場邦弘、中込治、中込とよ子、藤井克樹、片山和彦：我が国で流行したロタウイルスの遺伝子型の全国分布(2012年) 第54回日本臨床ウイルス学会、倉敷、2013.6.8-9.
- 52) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆宇、Jeffrey M. Bergelson、清水博之、エンテロウイルス71と受容体PSGL-1との結合：VP1-145が受容体特異性を制御する分子スイッチである、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 53) Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013.
- 54) 馬場昌範、外山政明、伊藤渉、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆宇、Sharon Ashoke。新規ピラノンカルボキサミド誘導体の抗HCV効果とその構造活性相関。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日。
- 55) 福島慎二、中野貴司、清水博之、水野泰孝、濱田篤郎：日本人渡航者への不活化ポリオワクチン追加接種。日本渡航者医学会。東京、2013.7.20-21.
- 56) 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究(2012年) 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013.11.10-12.
- 57) 藤井克樹：ロタウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会第25回学術集会、神戸、2013.11.9.
- 58) 藤井克樹：ロタウイルスの分子疫学 衛生微生物技術協議会第34回研究会、名古屋、2013.7.11-12.
- 59) 藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、中込とよ子、中込治、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第54回日本臨床ウイルス学会、倉敷、2013.6.8-9.
- 60) 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆宇、朝比奈靖浩、坂本直哉。HCV Core 領域アミノ酸70/91変異株を用いた反応機序の解析。第49回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.6-7.
- 61) 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化とHepatic Lipase発現制御、日本ウイルス

- 学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 62) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗、細胞内発現抗体 (イントラボディ) による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 63) 三浦忍、野口篤子、藤井克樹、中込治、片山和彦、中込とよ子、高橋勉: 秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 倉敷, 2013. 6. 8-9.
- 64) 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法: ワクシニアウイルス DIs 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症予防効果、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
- 65) 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦: ノロウイルス小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 倉敷, 2013. 6. 8-9.
- 66) 村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣. HCV NS5A キメラウイルスを用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12.
- 67) 村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013. 12. 3-6.
- 68) 室井敦、高濱正吉、高橋宏隆、竹田浩之、鈴木哲朗、脇田隆字、澤崎達也、コムギ無細胞タンパク質アレイを用いた HCV プロテアーゼの網羅的基質探索、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 69) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、佐藤彩、岡智一郎、片山和彦、野田衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳. ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 70) 山田典栄, 四柳 宏, 池田裕喜, 小林稔, 奥瀬千晃, 森屋恭爾, 安田清美, 鈴木通博, 伊東文生, 加藤孝宣, 脇田隆字, 小池和彦. 国内感染と考えられる B 型肝炎ウイルス genotype H の一例. 第 17 回日本肝臓学会大会, 東京, 2013. 10. 9-10.
- 71) 山田典栄, 加藤孝宣, 四柳 宏. B 型肝炎ウイルス症例における HBV S 領域のアミノ酸変異の検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会, 岐阜, 2013. 12. 6-7.
- 72) 山中敦史、鈴木亮介、小西英二. キメラ Dengue ウイルス様粒子抗原の中和及び感染増強試験における有用性評価. 日本熱帯医学会第 54 回大会, 長崎, 2013 年 10 月 3-5 日.
- 73) 横川寛, 森山正樹, 中村紀子, 東濃篤徳, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆字. 霊長類モデルを用いた培養細胞由来 HCV ワクチンの有効性の検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11. 10-12.
- 74) 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤裕徳. 分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 75) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗. 細胞内発現抗体 (イントラボディ) による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 76) 横川寛, 森山正樹, 中村紀子, 東濃篤徳, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆字. アカゲザルを用いた培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの抗体誘導能と安全性の検討. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013. 12. 3-6.
- 77) 李 天成、Tingting Yang, Wei Li, Daiwei Guan, Ling Fang. Juan Su, Changwen Ke, 武田直和、脇田隆字: 中国における Rat HEV の感染調査. 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月 岐阜.
- 78) 李 天成、楊 婷婷、片岡紀代、網 康至、須崎百合子、岸田典子、白倉 雅之、今井正樹、浅沼秀樹、武田直和、脇田隆字: フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用.

- 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月神戸.
- 79) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字。シチジンデアミナーゼ AID 誘導を介した抗 B 型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解明。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 80) Tingting Yang、落合香織、脇田隆字、石井孝司、李 天成：スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析、第 5 4 回日本臨床ウイルス学会、平成 25 年 6 月、倉敷
- 81) 脇田隆字、安東友美、林和彦、杉山真也、石上雅敏、片野義明、後藤秀実、溝上雅史、黒田誠、相崎英樹、患者血清中における HCV ゲノム多様性の存在形式、第 4 9 回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、(2013, 6. 6-7)、ワークショップ 3「ウイルス肝炎の新潮流」
- 82) 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字、エンベロープペプチドを用いた HCV 感染に重要なアミノ酸領域の探索、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11. 10-12)
- 6) 片山和彦 平成 25 年 7 月 6 日 武田薬品工業主催 ノロウイルスセミナー (東京メトロポリタン丸の内) ノロウイルスの基礎
- 7) 片山和彦 平成 25 年 7 月 13 日 北里セミナー (北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール) ノロウイルス感染症
- 8) 片山和彦 平成 25 年 10 月 18 日 「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域専門家会議の講師 (秋田県秋田市中通 6-1-3 イヤタカ) 下痢症ウイルスの基礎と分子疫学
- 9) 片山和彦 平成 25 年 11 月 5 日 郡山市主催講演会 ノロウイルス食中毒発生防止対策及び感染症発生防止対策について (福島県産業交流館 ビッグパレットふくしま)
- 10) 片山和彦 平成 25 年 12 月 4 日 社団法人福島県食品衛生協会主催 講習会 ノロウイルス食中毒の予防と対策 (福島県福島市三河南町 1-20 コラッセ福島 4 階ホール)
- 11) 加藤孝宣. ビタミン D の抗 HCV 作用. フェロン・ビタミン D 講演会 -プロテアーゼ阻害剤不応症例に対するビタミン D の可能性を考える-, 東京. 2013. 4. 11.
- 12) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. 平成 25 年度希少感染症診断技術研修. 東京、2014. 2. 20
- 13) 清水博之: エンテロウイルス 71 感染と病原性発現の分子的基盤. 金沢医科大学大学院医学研究セミナー. 金沢、2013. 10. 25
- 14) 清水博之: ポリオの現状と不活化ポリオワクチン導入後の課題. 平成 25 年度感染症危機管理研修会. 東京、2013. 10. 17
- 15) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状. 第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」. 横浜市、2013. 6. 5.
- 16) 鈴木亮介. C 型肝炎ウイルスの粒子形成に重要な新規 NS2 結合宿主因子の同定. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 教育セミナー 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- III. その他
- 1) 片山和彦 平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業. 第 42 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み-ウイルス感染症に挑む-」ノロウイルスたんぱく質構造と抗ウイルス薬、平成 25 年 12 月 9 日 日曜日
- 2) 片山和彦 平成 26 年 1 月 18 日 土曜日 第 13 回東北臨床感染症研究会 勝山館 4 階「貴賓室」宮城県仙台市青葉区上杉 2 丁目 1-50 「腸管感染症」“ノロウイルス”
- 3) 片山和彦 平成 25 年 5 月 23 日 日本食品工業クラブ講演会 ノロウイルス感染症
- 4) 片山和彦 平成 25 年 6 月 4 日 関東労災病院主催 講演会 (川崎市) ノロウイルス感染症
- 5) 片山和彦 平成 25 年 6 月 18 日 シラバス・知の広場 (感染研戸山庁舎共用第一会議室) ウイルス性食中毒

ウイルス第二部

(テレビ放送) 出演、指導、監修

2013年11月25日 ワイド!スクランブル

2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノロウイルス
見えない感染を防げ

2014年1月17日 NHK ノロ対策「塩素系漂白剤で消毒
を」

2013年12月6日 日本テレビ ニュースエブリィ

2014年1月14日 読売テレビ 朝生ワイドす・またん!

2014年1月20日 日本テレビ NEWS ZERO

2014年1月20日 NHK NEWSWEB

2014年1月23日 日本テレビ スッキリ!!

2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノロウイルス
の流行状況

(ラジオ番組) 出演

2014年1月23日 垣花正あなたとハッピー “ノロウイ
ルスの流行について”

2014年1月28日 NHKラジオ第一 NHKジャーナル